Nancy-Université
Université Henri Poincaré

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

➢ Contact SCD Nancy 1 : theses.sante@scd.uhp-nancy.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY 1

2010

FACULTE DE PHARMACIE

Diagnostic moléculaire des cancers colorectaux métastatiques : Facteurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées anti-EGFR et organisation du génotypage KRAS en Lorraine.

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 17 juin 2010

pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par **Sandra PARENTE**

Née le 26 avril 1983 à Thionville (57)

Membres du Jury

Président :	M. MERLIN Jean-Louis	Professeur, Unité de Biologie des Tumeurs, centre Alexis Vautrin
Juges :	Mme DEMORE Béatrice	Maître de Conférences, Faculté de Pharmacie
	Mme KAMINSKY Marie Christine	Oncologue médical au centre Alexis Vautrin

UNIVERSITE Henri Poincaré - Nancy 1
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Mobilité ERASMUS et Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine :	Francine PAULUS
Responsables de la filière Industrie :	Isabelle LARTAUD, Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable du Collège d'Enseignement : Pharmaceutique Hospitalier	Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Gérald CATAU

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

Parente Sandra – Juin 2010

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Gills AULAGNER .....Pharmacie clinique

Alain BAGREL.....Biochimie

Jean-Claude BLOCK .....Santé publique

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON .....Pharmacologie cardiovasculaire

Chantal FINANCE.....Virologie, Immunologie

Pascale FRIANT-MICHEL.....Mathématiques, Physique, Audioprothèse

Christophe GANTZER .....Microbiologie environnementale

Max HENRY .....Botanique, Mycologie

Jean-Yves JOUZEAU.....Bioanalyse du médicament

Pierre LABRUDE.....Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile

Isabelle LARTAUD.....Pharmacologie cardiovasculaire

Dominique LAURAIN-MATTAR.....Pharmacognosie

Brigitte LEININGER-MULLER .....Biochimie

Pierre LEROY .....Chimie physique générale

Philippe MAINCENT .....Pharmacie galénique

Alain MARSURA .....Chimie thérapeutique

Patrick MENU .....Physiologie

Jean-Louis MERLIN.....Biologie cellulaire oncologique

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS .....Chimie thérapeutique

Bertrand RIHN .....Biochimie, Biologie moléculaire

Jean-Michel SIMON.....Economie de la santé, législation pharmaceutique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS .....Parasitologie

Mariette BEAUD .....Biologie cellulaire

Emmanuelle BENOIT .....Communication et santé

Isabelle BERTRAND.....Microbiologie environnementale

Michel BOISBRUN .....Chimie thérapeutique

François BONNEAUX .....Chimie thérapeutique

Ariane BOUDIER.....Chimie Physique

Cédric BOURA.....Physiologie

Jean-Claude CHEVIN .....Chimie générale et minérale

Igor CLAROT .....Chimie analytique

Joël COULON.....Biochimie

Sébastien DADE.....Bio-informatique

Dominique DECOLIN .....Chimie analytique

Béatrice DEMORE.....Pharmacie clinique

Joël DUCOURNEAU .....Biophysique, audioprothèse, acoustique

Florence DUMARCAY.....Chimie thérapeutique

François DUPUIS.....Pharmacologie

Raphaël DUVAL .....Microbiologie clinique

Béatrice FAIVRE .....Hématologie - Génie Biologique

Adel FAIZ.....Biophysique-acoustique

Luc FERRARI .....Toxicologie

Stéphane GIBAUD .....Pharmacie clinique

Thierry HUMBERT .....Chimie organique

Frédéric JORAND .....Santé et environnement

Olivier JOUBERT.....Toxicologie, sécurité sanitaire

Francine KEDZIEREWICZ .....Pharmacie galénique

Alexandrine LAMBERT .....Informatique, Biostatistiques

Faten MERHI-SOUSSI.....Hématologie biologique

Christophe MERLIN .....Microbiologie environnementale et moléculaire

Blandine MOREAU .....Pharmacognosie

Maxime MOURER.....Pharmacochimie supramoléculaire

Francine PAULUS .....Informatique

Christine PERDICAKIS .....Chimie organique

Caroline PERRIN-SARRADO .....Pharmacologie

Virginie PICHON .....Biophysique

Anne SAPIN.....Pharmacie galénique

Marie-Paule SAUDER .....Mycologie, Botanique

Nathalie THILLY .....Santé publique

Gabriel TROCKLE .....Pharmacologie

Marie-Noëlle VAULTIER.....Biodiversité végétale et fongique

Mohamed ZAIOU .....Biochimie et Biologie moléculaire

Colette ZINUTTI .....Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER .....Sémiologie

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD .....Anglais

Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois

(Pharmacie - Odontologie)

Anne-Pascale PARRET.....Directeur

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

A mon directeur de thèse et président du jury Monsieur le professeur **Jean-Louis Merlin**. Merci pour votre aide, votre disponibilité et tous vos bons conseils. Que se travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Merci à **Mme Demoré** et **à Mme Kaminsky** pour avoir accepté d'être membre de ce jury.

Merci à mes maîtres de stage officinaux et à mon maître de stage hospitalier ainsi que toutes leurs équipes. Je vous suis reconnaissante du savoir et de l'art de la pharmacie que vous avez su me transmettre. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble.

Merci à la faculté de Pharmacie de Nancy pour l'enseignement de qualité de mes 6 années d'étude.

Je dédie cette thèse à mes parents. J'espère que vous serez fiers de moi. Avec tout mon amour…

A Jérémie et Léticia, mon frère, ma sœur, vous comptez beaucoup pour moi. Je vous souhaite le meilleur pour l'avenir.

A Julien, mon présent et mon futur. Merci.

A toute ma famille et à ma nouvelle famille, pour son soutien. Merci pour vos encouragements et votre compréhension.

A mes disparus…

A tous ceux qui n'ont jamais cru en moi, vous m'avez donné la force de me battre.

« *La véritable culture, celle qui est utile, est toujours une synthèse entre le savoir accumulé et l'inlassable observation de la vie.* »
Francesco Alberoni

Table des matières

Remerciements **10**

Listes des abréviations **18**

Introduction **23**

PARTIE I : **25**

I. Epidémiologie **26**

II. Prévention primaire **27**

1. Facteurs nutritionnels et comportementaux 27
2. Facteurs héréditaires 29
   a. HNPCC 29
   b. PAF 29

III. Prévention secondaire **30**

1. Dépistage dans la population générale 30
2. Dépistage des populations à risques 34
   a. Risque élevé 35
   b. Risque très élevé 35

IV. Diagnostic **36**

1. Clinique 36
2. Coloscopie 36
3. Autres examens 37
   a. Examen biologique 37
   b. Imagerie 37
   c. Classifications 37

V. Les traitements 39

1. Chirurgie 40
2. Radiothérapie 40
3. Chimiothérapie 40
   a. Cancer colorectal non métastatique 40
   b. Cancer métastatique 41
   c. Evaluation de la chimiothérapie 44
   d. Surveillance de la chimiothérapie 45
   e. Effets indésirables 45

VI. Surveillance 46

PARTIE II : 47

I. Qu'est-ce-que l'EGFR 48

1. Structure 48
2. Localisation 49
3. Ligand 49
4. Mécanisme d'action 50
5. Rôle 51
6. Inhibition de l'EGFR 51
7. EGFR au niveau de la cellule tumorale 52

II. Rappel sur les anticorps monoclonaux 53

1. Structure 53
2. Liaison Ag-Ac 55
3. Action 56
   a. ADCC 56
   b. Lyse cellulaire par le complément 57

4. Fabrication 58
III. Cétuximab (Erbitix®) 61
1. Présentation 61
2. Structure 61
3. Mode d'administration 61
4. Pharmacodynamie 62
5. Utilisation 62
6. Posologie 64
7. Effets indésirables 64
IV. Panitumumab (vectibix®) 65
1. Présentation 65
2. Structure 65
3. Mode d'administration 65
4. Pharmacodynamie 65
5. Utilisation 65
6. Posologie 66
7. Effets indésirables 66
PARTIE III : 68
I. Qu'est-ce qu'un biomarqueur? 69
1. Définition 69
2. Les marqueurs biologiques 70
a. Marqueur biologique de la cible : EGFR 70
b. Les ligands de l'EGFR 71
c. Les voies de signalisation de l'EGFR. 72
d. Toxicité cutané 79

PARTIE IV : 81

I. Présentation de l'INCa 82

II. De la biopsie à l'analyse 84

III. L'analyse 88

1. PCR RFLP 88

   a. Principe 88

   b. Analyse 90

   c. Exemple de résultat 91

2. Taqman 91

   a. Principe 91

   b. Analyse 92

   c. Exemple de résultat 93

   d. Analyse d'un locus pour l'ensemble des patients : exemple 122 GT. 93

   e. Analyse d'un locus pour un patient donné: Exemple patient 12 et locus 122 GT. 94

3. PCR HRM 95

   a. Principe 95

   b. Analyse 96

   c. Exemple de résultat 97

4. Avantages et inconvénient de chaque méthode 100

IV. Enquête de satisfaction 101

1. Etat des lieux 101

2. Statistiques de l'activité du service de juin 2008 à décembre 2009 101

3. Questionnaire 102

4. Enquête auprès de 180 professionnels de santé 102

a. Vous 102
b. Nos échanges 103
c. Les délais 104
5. Analyse de l'enquête 106
a. Vous 106
b. Nos échanges 107
c. Les délais 107
d. Délais et oncologues 108
Conclusion 109
Glossaire de chimiothérapie 111
Bibliographie 113
Ouvrages consultés 120
Sites internet consultés 121
Annexe 1 122
Annexe 2 125

Table des figures

Figure 1: Tableau récapitulatif du nombre de décès en 2005 par cancer selon le sexe (Hill, 2008). *26*

Figure 2: Résumé des recommandations pour la prévention primaire des cancers (fiche repère INCa, 2009) *28*

Figure 3: Hemoccult II *31*

Figure 4: Mode d'emploi de l'Hemoccult II pour les patients. *32*

Figure 5: Résultat positif de la recherche de sang dans les selles. *33*

Figure 6: Résultat négatif de la recherche de sang dans les selles. *33*

Figure 7: Stratégie mise en place suite au dépistage de masse du cancer colo rectal (Cancéroguide; 2007) *34*

Figure 8: Classification TNM (référentiel Oncolor, Carol et Oncolie, 2009). *38*

Figure 9: Classification en stade (référentiel Oncolor, Carol et Oncolie, 2009). *39*

Figure 10: Arbre décisionnel dans le cas de métastases métachrones. (Référentiel Oncolor, Carol et Oncolie, 2009) *42*

Figure 11: Arbre décisionnel dans le cadre de métastases synchrones (Référentiel Oncolor, Carol et Oncolie, 2009) *44*

Figure 12 : Structure du récepteur à l'EGF. *48*

Figure 13 : Les ligands de récepteurs HER *50*

Figure 14 : Représentation des 2 voies principales de signalisation cellulaire (Cahier scientifique Merck). *51*

Figure 15: Expression de l'EGFR dans différents types de cancer. *52*

Figure 16: Structure de base d'un anticorps. *54*

Figure 17: Les différents domaines d'un anticorps. *55*

Figure 18: Représentation de l'interaction antigène-anticorps. *56*

Figure 19: Mécanisme de l'ADCC *57*

Figure 20: Les différentes étapes de l'activation du complément. *58*

Figure 21: La production des anticorps monoclonaux. *59*

Figure 22 : Evolution chronologique des anticorps monoclonaux (Prin-Mathieu, 2003) *60*

Figure 23: Représentation de la survie sans progression(A) et de la survie globale (B) de l'étude BOND (Cunningham, 2004). *62*

Figure 24 : Impact du traitement (cétuximab+ FOLFIRI vs FOLFIRI seul) sur des tumeurs non mutées KRAS (étude CRYSTAL) et représentation de la survie sans progression (C) et de la survie globale (D) (Van Cutsem , 2009). . *63*

Figure 25 : Représentation de la survie sans progression en fonction du traitement (cétuximab+ FOLFOX 4 (A) versus FOLFOX 4 (B)) et en fonction de la mutation KRAS (étude OPUS) (Bokemeyer, 2009). *64*

Figure 26 : Effet du panitumumab sur la survie sans progression par rapport à un traitement palliatif (Amodo, 2008) *66*

Figure 27 : Localisation des mutations KRAS..... *73*

Figure 28: Représentation de la survie sans progression (A) et de la survie globale (B) en fonction de la présence ou l'absence de mutation KRAS (Lièvre, 2008). *74*

Figure 29: Mode d'action du cétuximb (Erbitux) quand le gène KRAS est de type sauvage. *75*

Figure 30: Perturbation entrainée par un KRAS muté. *76*

Figure 31 : Algorithme de réponse au cétuximab en fonction du statut de KRAS, PTEN et de l'EGFR (Frattini, 2007). *79*

Figure 32 : Plateformes de génétique moléculaire des cancers (INCa, 2009). *84*

Figure 33 : Interaction entre le prescripteur, le pathologiste et le laboratoire. *85*

Figure 34:Microtome et ruban de paraffine..... *85*

Figure 35: La lame et le bloc..... *86*

Figure 36: Correspondance entre la zone cerclée par l'anatomopathologiste et le bloc *86*

Figure 37: Kit QIAGEN *87*

Figure 38: Principe de la PCR..... *89*

Figure 39 : Résultat de PCR-RFLP. *91*

Figure 40: Principe de la sonde Taqman. *92*

Figure 41 : Représentation à la sonde VIC de l'ensemble des patients pour le locus 122GT. *94*

Figure 42 : Représentation à la sonde FAM de l'ensemble des patients pour le locus 122GT...... *94*

Figure 43 : Représentation à la sonde VIC d'une tumeur mutée KRAS...... *95*

Figure 44 : Représentation à la sonde FAM d'une tumeur mutée KRAS. *95*

Figure 45: Principe de la PCR-HRM..... *96*

Figure 46 : Courbe d'amplification. *97*

Figure 47 : Représentation « Normalized melting curves ». Le patient en vert suit le profil du témoin non muté violet..... *98*

Figure 48 : Représentation « Normalized and temp-shifted difference plot ». Le patient en vert se situe près du témoin non mute...... *98*

Figure 49 : Représentation « Normalized melting curves ». Le patient en orange se rapproche du témoin muté en rouge. *99*

Figure 50 : Représentation « Normalized and temp-shifted difference plot". Le patient en orange a le même profil que le témoin mute violet. *99*

LISTES DES ABREVIATIONS

A

Ac: anticorps

ACE: antigène carcino-embryonnaire

ADCC: antibody dependent cellular cell (Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps)

AICR: american institute for cancer research

Ag: antigène

AMM : autorisation de mise sur le marché

AND: acide désoxyribonucléique

AREG: amphirégulline

ARN: acide ribonucléique

B

BOND: bowel oncology antibody

C

CAM : complexe d'attaque membranaire

CAV : centre Alexis Vautrin de Nancy

CCR: cancer colorectal

CRYSTAL: cétuximab combined with irinotecan in first line therapy for metastatic colorectal cancer

CCRm: cancer colorectal métastatique

CL : domaine constante de la chaîne légère d'un anticorps

CH: domaine constant de la chaîne lourde de l'anticorps

CDR : complementary determining region

D

dNTP: désoxyribonucleotide triphosphate

E

EGFR: epidermal growth factor receptor

EGF: epidermal growth factor

EREG: épirégulline

F

Fab: fragment antigen binding

Fc: fragment crystallizable

FR: framework

G

GAPs: GTP-ase activation protein

GEPs: guanine exchange protein

GTP: guanosine triphosphate

GDP: guanosine diphosphate

G-CSF: granulocyte colony stimuling factor

H

HNPCC: Heriditary NonPolyposis Colorectal Cancer ou syndrome de Lynch

HER: human epidermal growth factor

I

INCa: Institut National du Cancer

Ig: immunoglobuline

K

KRAS: Kristen ras sarcoma 2 viral oncogene homologue

L

LDH: lactate déshydrogénase

M

MAP Kinase : mitogen-actived protein kinase

MMR : mis match repair

Morpho-TEP : tomographie à émission de positons

MOKAECM : évaluation de la détection des mutations de l'oncogène KRAS pour le traitement par les anticorps anti-EGFR des patients porteurs d'un cancer colorectal métastatiques

MSI : instabilité microsatellitaire

N

NFS : numération formule sanguine

NK : natural killer

O

OMS : organisation mondiale de la santé

P

PAF : Polypose adénomateuse familiale ou syndrome de Gardner

PCR: polymerase chain reaction

PCR-RFLP: polymerase chai reaction - restriction fragment length polymorphism

PCR HRM: polymerase chain reaction – high reaction melt

PI3K: phosphatidylinositol-3-kinase

PI3P: phosphatidylinostol-3-phosphate

PI2P: phosphatidylinositol-2-phosphate

PTEN: phosphatase and tensin homolog

R

RER: replication error

S

STIC : soutien aux technologies innovantes et coûteuses

T

TDM: tomodensitométrie

TGF: transforming growth factor

TK : tyrosine kinase

TNM : propagation de la maladie sur le site de la tumeur primitive (T), envahissement ganglionnaire (N) et présence de métastases (M) à distance de la tumeur primitive

V

VEGF: vascular endothelial growth factor

VH: domaine variable de la chaine constante

VL: domaine variable de la chaine légère

W

WCRF: world cancer research fund

INTRODUCTION

Le cancer colorectal est un problème majeur de santé publique. C'est la deuxième cause de décès par cancer en France, juste après le cancer des poumons. La prise en charge du patient cancéreux est difficile. Elle est dépendante du stade de la maladie, de l'état général du patient notamment. A un stade précoce, la chirurgie pourra suffire à la rémission du patient. Mais dans de nombreux cas, il faudra recourir à la chimiothérapie. Celle-ci peut être :

- Curative
- Adjuvante à la chirurgie
- Néoadjuvante à la chirurgie
- Palliative.

Les traitements innovants rentrent dans le cadre d'une chimiothérapie. Ce sont des traitements « à la carte » ne s'utilisant qu'à certaines conditions et que pour certains types de cancer. Ces thérapies dépendent des altérations cellulaires présentent dans le tissu tumoral. Deux types de thérapies ciblées sont utilisés dans le cas d'une chimiothérapie pour un CCRm. Le bévacizumab interagit avec le récepteur au VEGF et le cétuximab et le panitumumab avec le récepteur à l'EGF. La condition nécessaire au bon fonctionnement des thérapies ciblées anti-EGFR est la présence d'une tumeur non mutée au niveau du gène KRAS. Ce n'est pas le cas du Bévacizumab qui peut être utilisé quelque soit le statut KRAS de la tumeur. L'évaluation de cette mutation est fondamentale dans la prise en charge thérapeutique du patient. Le cétuximab et le panitumumab sont les seuls anticorps anti-EGFR ayant l'AMM pour ce cancer et sous cette condition. D'autres facteurs prédictifs de réponse à ces traitements sont en cours d'études.

Dès 2006, l'Institut National du Cancer (INCa) a labélisé 28 plateformes au niveau national pour donner accès aux thérapies innovantes à tous les patients. En Lorraine, la plateforme est commune au CHU et au Centre Régional de Lutte contre le Cancer Alexis Vautrin et le génotypage KRAS est organisé par l'unité de biologie des tumeurs du Centre Alexis Vautrin de Nancy. Pour permettre une prise en charge optimale du patient, la collaboration entre le clinicien (qui prescrit le génotypage), l'anatomopathologiste (qui analyse les blocs incluant une partie de la tumeur) et le laboratoire (qui recherche la mutation KRAS) est primordiale. Afin d'évaluer son degré d'efficience, l'unité de biologie des tumeurs a envoyé un questionnaire de

satisfaction à 180 professionnels de santé de Lorraine. Nous en présentons et analysons les résultats dans cette thèse.

PARTIE I :

Généralités

I. EPIDEMIOLOGIE

En 2005, 149000 décès par cancer ont été répertoriés en France avec une répartition inégale selon le sexe : 89000 chez les hommes contre 60000 chez les femmes. Le cancer colorectal entraina la mort de 8900 hommes et de 8000 femmes (Hill, 2008) (figure 1).

Localisation	CIM10*	Hommes	Femmes
Bouche, pharynx & larynx	C00 à C14 + C32	4 699	879
Œsophage	C15	3 258	668
Estomac	C16	3 045	1 789
Côlon et rectum	C18 à C21 + C26.0	8 887	8 001
Foie	C22	5 457	1 882
Vésicule	C23 + C24	499	725
Pancréas	C25	4 192	3 857
Poumon	C33 à C34	21 901	5 949
Mélanome	C43	799	713
Sein	C50	201	11 308
Col utérin	C53 + x % C55		1 578
Endomètre	C54 + (1-x %) C55		1 384
Ovaire	C56 + C57.0 à C57.4		3 338
Prostate	C61	9 099	
Testicule	C62	102	
Rein	C64 à C66 + C68	2 438	1 330
Vessie	C67	3 585	1 126
Encéphale	C70 à C72	1 644	1 283
Thyroïde	C73	132	263
Hodgkin	C81	166	108
Lymphome non hodgkinien	C82 à C85 + C96	2 221	2 038
Myélome	C88 + C90	1 375	1 341
Leucémies	C91 à C95	2 929	2 433
Autres		12 149	8 111
Tous cancers		88 778	60 104

* CIM10 : classification internationale des maladies, dixième révision.

Figure 1: Tableau récapitulatif du nombre de décès en 2005 par cancer selon le sexe (Hill, 2008).

C'est la troisième tumeur maligne la plus diagnostiquée dans le monde d'après l'étude GLOBOCAN (Parkin, 2001) et le deuxième cancer le plus meurtrier après celui des poumons dans les pays occidentaux (Parker, 1997). C'est la tumeur du tube digestif, la plus fréquente.

II. PREVENTION PRIMAIRE

Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la prévention primaire est l'ensemble des moyens mis en œuvre pour empêcher l'apparition d'un trouble, d'une pathologie ou d'un symptôme.
Dans le cas de ce cancer, la prévention primaire consiste à trouver des facteurs de risque entraînant la maladie.

1. Facteurs nutritionnels et comportementaux

La World Cancer Research Fund (WCRF) et l'American Institute for Cancer Research (AICR) ont fait une étude sur l'influence de la nutrition (comprenant l'activité physique et l'alimentation) sur la survenue de cancer. Ces conclusions ont été reprises par INCa (Institut National du Cancer) dans une fiche repère datée du 24 juillet 2009 (figure 2).

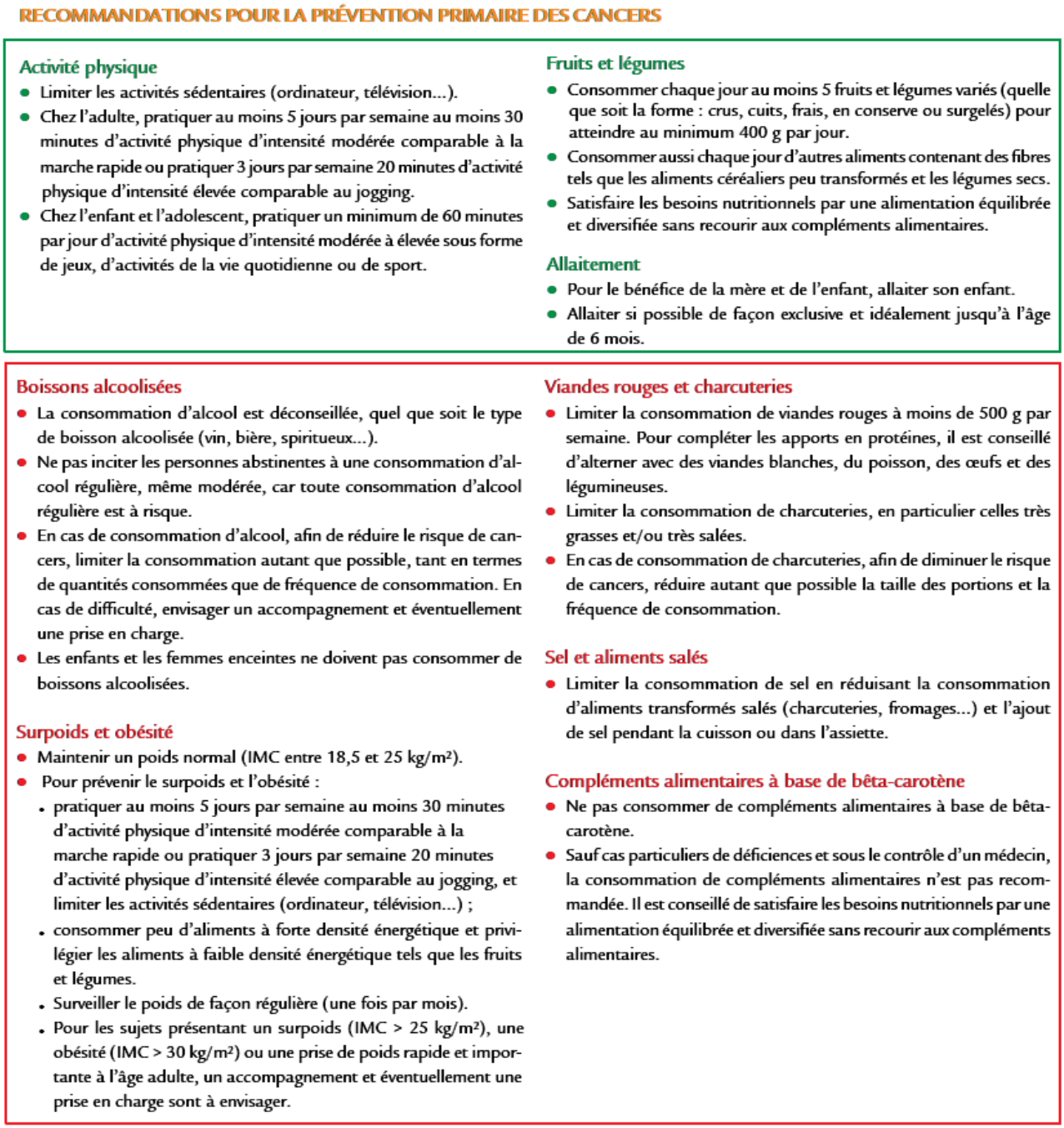

RECOMMANDATIONS POUR LA PRÉVENTION PRIMAIRE DES CANCERS
Activité physique
Limiter les activités sédentaires (ordinateur, télévision...).
Chez l'adulte, pratiquer au moins 5 jours par semaine au moins 30 minutes d'activité physique d'intensité modérée comparable à la marche rapide ou pratiquer 3 jours par semaine 20 minutes d'activité physique d'intensité élevée comparable au jogging.
Chez l'enfant et l'adolescent, pratiquer un minimum de 60 minutes par jour d'activité physique d'intensité modérée à élevée sous forme de jeux, d'activités de la vie quotidienne ou de sport.
Fruits et légumes
Consommer chaque jour au moins 5 fruits et légumes variés (quelle que soit la forme : crus, cuits, frais, en conserve ou surgelés) pour atteindre au minimum 400 g par jour.
Consommer aussi chaque jour d'autres aliments contenant des fibres tels que les aliments céréaliers peu transformés et les légumes secs.
Satisfaire les besoins nutritionnels par une alimentation équilibrée et diversifiée sans recourir aux compléments alimentaires.
Allaitement
Pour le bénéfice de la mère et de l'enfant, allaiter son enfant.
Allaiter si possible de façon exclusive et idéalement jusqu'à l'âge de 6 mois.
Boissons alcoolisées
La consommation d'alcool est déconseillée, quel que soit le type de boisson alcoolisée (vin, bière, spiritueux...).
Ne pas inciter les personnes abstinentes à une consommation d'alcool régulière, même modérée, car toute consommation d'alcool régulière est à risque.
En cas de consommation d'alcool, afin de réduire le risque de cancers, limiter la consommation autant que possible, tant en termes de quantités consommées que de fréquence de consommation. En cas de difficulté, envisager un accompagnement et éventuellement une prise en charge.
Les enfants et les femmes enceintes ne doivent pas consommer de boissons alcoolisées.
Surpoids et obésité
Maintenir un poids normal (IMC entre 18,5 et 25 kg/m²).
Pour prévenir le surpoids et l'obésité :
pratiquer au moins 5 jours par semaine au moins 30 minutes d'activité physique d'intensité modérée comparable à la marche rapide ou pratiquer 3 jours par semaine 20 minutes d'activité physique d'intensité élevée comparable au jogging, et limiter les activités sédentaires (ordinateur, télévision...) ;
consommer peu d'aliments à forte densité énergétique et privilégier les aliments à faible densité énergétique tels que les fruits et légumes.
Surveiller le poids de façon régulière (une fois par mois).
Pour les sujets présentant un surpoids (IMC > 25 kg/m²), une obésité (IMC > 30 kg/m²) ou une prise de poids rapide et importante à l'âge adulte, un accompagnement et éventuellement une prise en charge sont à envisager.
Viandes rouges et charcuteries
Limiter la consommation de viandes rouges à moins de 500 g par semaine. Pour compléter les apports en protéines, il est conseillé d'alterner avec des viandes blanches, du poisson, des œufs et des légumineuses.
Limiter la consommation de charcuteries, en particulier celles très grasses et/ou très salées.
En cas de consommation de charcuteries, afin de diminuer le risque de cancers, réduire autant que possible la taille des portions et la fréquence de consommation.
Sel et aliments salés
Limiter la consommation de sel en réduisant la consommation d'aliments transformés salés (charcuteries, fromages...) et l'ajout de sel pendant la cuisson ou dans l'assiette.
Compléments alimentaires à base de bêta-carotène
Ne pas consommer de compléments alimentaires à base de bêta-carotène.
Sauf cas particuliers de déficiences et sous le contrôle d'un médecin, la consommation de compléments alimentaires n'est pas recommandée. Il est conseillé de satisfaire les besoins nutritionnels par une alimentation équilibrée et diversifiée sans recourir aux compléments alimentaires.

Figure 2: Résumé des recommandations pour la prévention primaire des cancers (fiche repère INCa, 2009)

Il est toutefois difficile d'élaborer une nutrition « anti-cancer ».
Une alimentation équilibrée, la lutte contre le surpoids ainsi que la pratique d'une activité physique régulière sont les 3 points à favoriser pour prévenir une maladie quel qu'elle soit.
(Fiches repères INCa, 2009)

2. *Facteurs héréditaires*

5% des cancers colorectaux sont à prédisposition génétique.
Le syndrome de LYNCH ou HNPCC (Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer) ainsi que la polypose adénomateuse familiale (PAF) nommé syndrome de Gardner en font partis.

a. HNPCC

Ce syndrome est défini cliniquement par les critères d'Amsterdam II de 1999 suivant :

-Au moins 3 sujets atteints de cancer appartenant au spectre étroit du syndrome HNPCC et histologiquement prouvé

-unis 2à 2 par un lien de parenté au 1er degré sur 2 générations

-un des cancers au moins s'étant révélé avant l'âge de 50 ans

La transmission du gène muté de HNPCC est autosomique dominante.
Les mutations affectent des gènes du système de réparation de l'Acide désoxyribonucléique (ADN) : gène Mis Match Repair (MMR)

L'inactivation du système MMR entraîne un phénotype Réplication Error (RER) positif associé à une instabilité microsatellitaire (MSI). Les cellules tumorales exprimant ce phénotype sont donc instables. Le diagnostic moléculaire du syndrome de Lynch est basé sur l'analyse des gènes touchés par la mutation : gène MSH2, gène MLH1, gène MSH6 (Park, 1999). Les patients porteurs de la mutation peuvent développer un cancer du colon et du rectum, un cancer de l'endomètre, de l'estomac, de l'ovaire, de l'urothélium, ou des voies biliaires (Olschwang, 2004).

b. PAF

Elle se caractérise par une multitude de polypes disséminées sur le colon et le rectum.
La transmission est autosomique dominante dans le cas du gène APC localisé au chromosome 5 et autosomique récessive dans le cas du gène MYH.
Deux formes de PAF existent :

- La forme typique où APC à une pénétrance de 100%
- La forme atténuée où APC ou MYH ont une pénétrance inférieur à 100%.

La PAF se manifeste par plus de 100 adénomes coliques. Mais la maladie peut être atténuée si le nombre de polype est compris entre 10 et 100.

III. PREVENTION SECONDAIRE

Selon l'OMS, la prévention secondaire vise à la détection précoce des maladies, dans le but de les découvrir à un stade où elles peuvent être traitées.
Dans le cas du cancer, le dépistage consiste à détecter à son stade le plus précoce (guérison 9 fois sur 10 à un stade I) ou à détecter des éventuelles lésions précancéreuses et cela avant que la personne n'en ressente les symptômes. Le dépistage peut résulter d'une demande individuelle, spontanée ou privée. Mais il peut également se faire dans le cadre d'une action collective de santé publique

1. Dépistage dans la population générale

L'incidence su CCR est réduite grâce au dépistage par le test Hemoccult II ou test au gaïac (figue 3) (Mandel, 2000). Le principe de ce test est de mettre en évidence la présence d'un saignement occulte dans les selles.
Quand il y a du sang dans les selles, la présence de péroxydase est révélée (C. Guldenfels, 1990).
Dépister la population générale est très important car dans 80% des cas, ce cancer apparait chez des sujets n'appartenant à aucun groupe à risque.
Ce test est réalisé tous les 2 ans chez des sujets entre 50 et 74 ans asymptomatiques. D'après une étude cas-témoin il permet une réduction de 40% de la mortalité par cancer colorectal chez les sujets participants au dépistage par rapport aux non participant (Faivre, 2002). La sensibilité de HEMOCCULT se situe entre 50% et 60% pour les cancers. D'où l'important de le réaliser tous les 2 ans. La spécificité est de 98% (INCa, 2008). Hemoccult est remis par le médecin au patient qui l'enverra au laboratoire.

Figure 3: Hemoccult II

<u>Comment se déroule Hemoccult :</u>

(http://www.oncoprof.net/Generale2000/g03_Depistage/Index/index_dp11.htm)

Le patient dépose une petite quantité de selles de la taille d'une lentille sur un papier avec trois ronds imprégnés de gaïac. Le patient doit prélever à deux endroits différents.

Le prélèvement est fait sur trois selles successives. Donc le patient renverra 3 plaquettes au laboratoire. Le sang n'est pas émis en permanence dans les selles, faire 3 prélèvements à 2 endroits différents augmente les chances d'en trouver (figure 4).

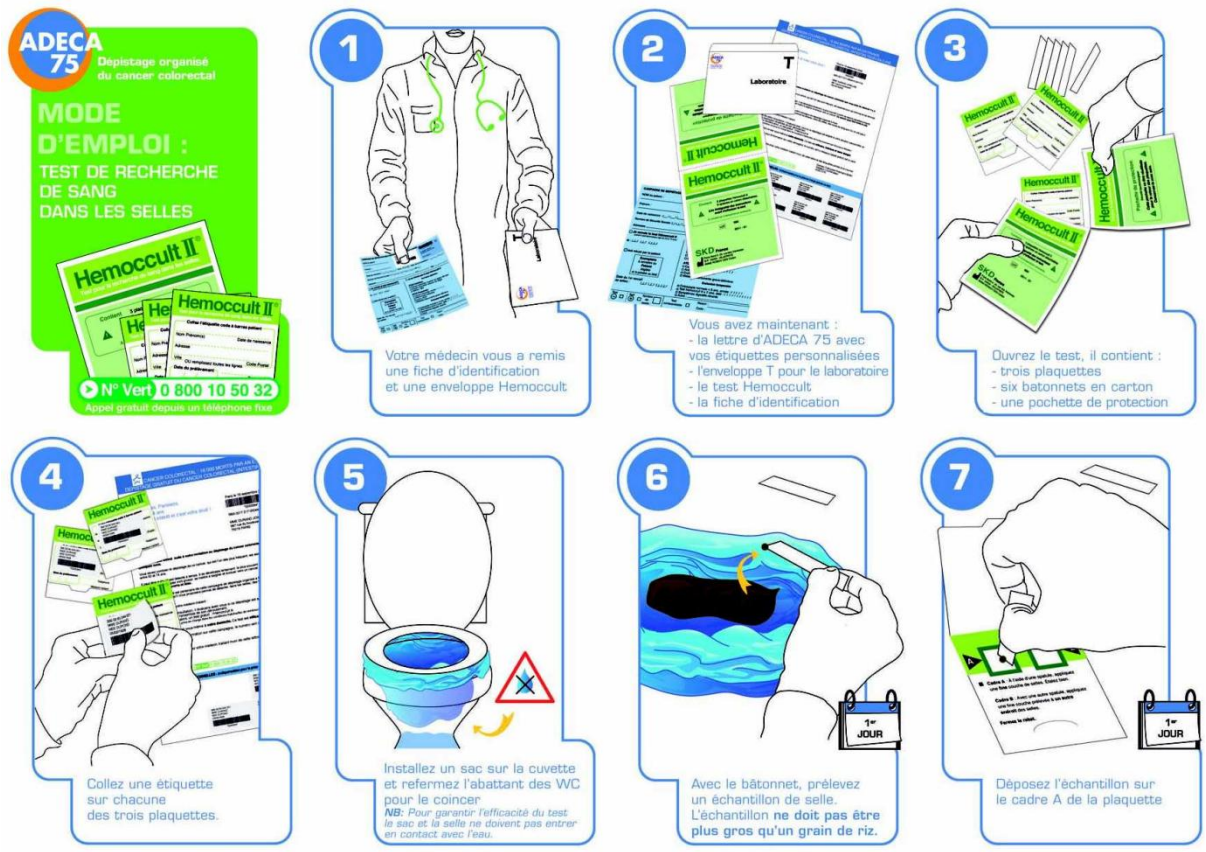

ADECA 75
Dépistage organisé du cancer colorectal
MODE D'EMPLOI :
TEST DE RECHERCHE DE SANG DANS LES SELLES
Hemoccult II
N° Vert 0 800 10 50 32
Appel gratuit depuis un téléphone fixe
1
Votre médecin vous a remis une fiche d'identification et une enveloppe Hemoccult
2
Vous avez maintenant :
- la lettre d'ADECA 75 avec vos étiquettes personnalisées
- l'enveloppe T pour le laboratoire
- le test Hemoccult
- la fiche d'identification
3
Ouvrez le test, il contient :
- trois plaquettes
- six batonnets en carton
- une pochette de protection
4
Collez une étiquette sur chacune des trois plaquettes.
5
Installez un sac sur la cuvette et refermez l'abattant des WC pour le coincer
NB: Pour garantir l'efficacité du test le sac et la selle ne doivent pas entrer en contact avec l'eau.
6
Avec le bâtonnet, prélevez un échantillon de selle.
L'échantillon ne doit pas être plus gros qu'un grain de riz.
1er JOUR
7
Déposez l'échantillon sur le cadre A de la plaquette
1er JOUR

Figure 4: Mode d'emploi de l'Hemoccult II pour les patients.

Le papier est envoyé au laboratoire où il est réhydraté. Vient ensuite l'ajout d'une solution alcoolique oxygénée. Une réaction positive se traduit par une coloration bleue (figure 5 et 6).

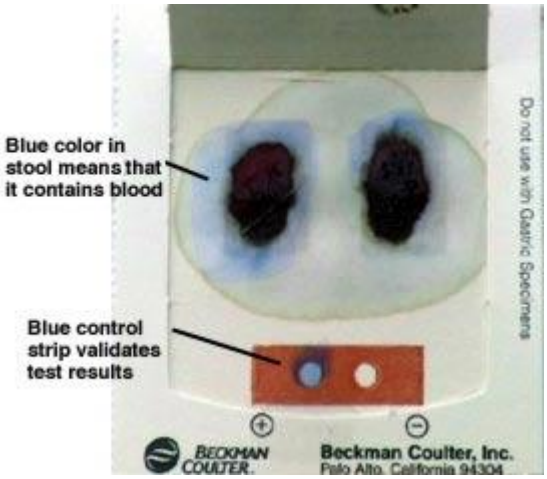


Figure 5: Résultat positif de la recherche de sang dans les selles.

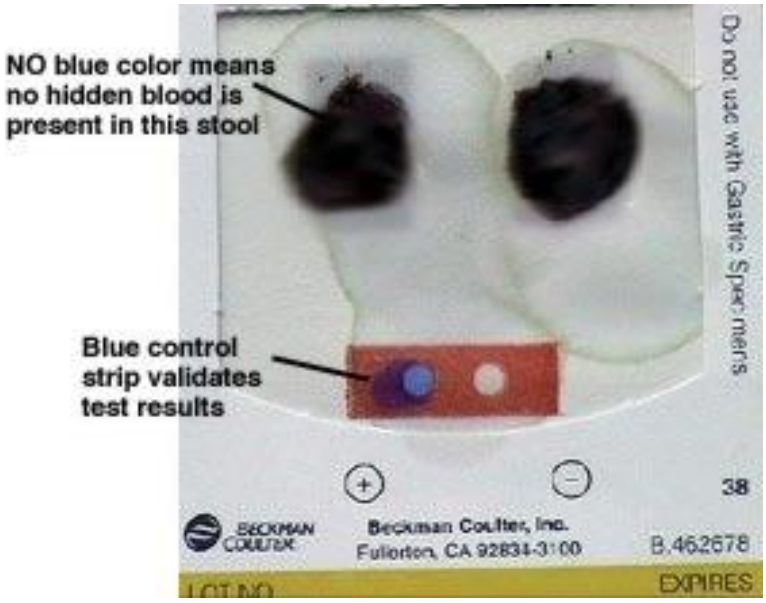


Figure 6: Résultat négatif de la recherche de sang dans les selles.

Après une réaction positive, une coloscopie sera réalisée (Faivre, 2002) (figure 7).

Certaines personnes sont exclues du dépistage par Hemoccult comme les sujets avec des symptômes digestifs, les sujets à risque élevé, ceux ayant eu une coloscopie depuis mois de 5 ans et ceux atteints d'une maladie grave extra-intestinale.

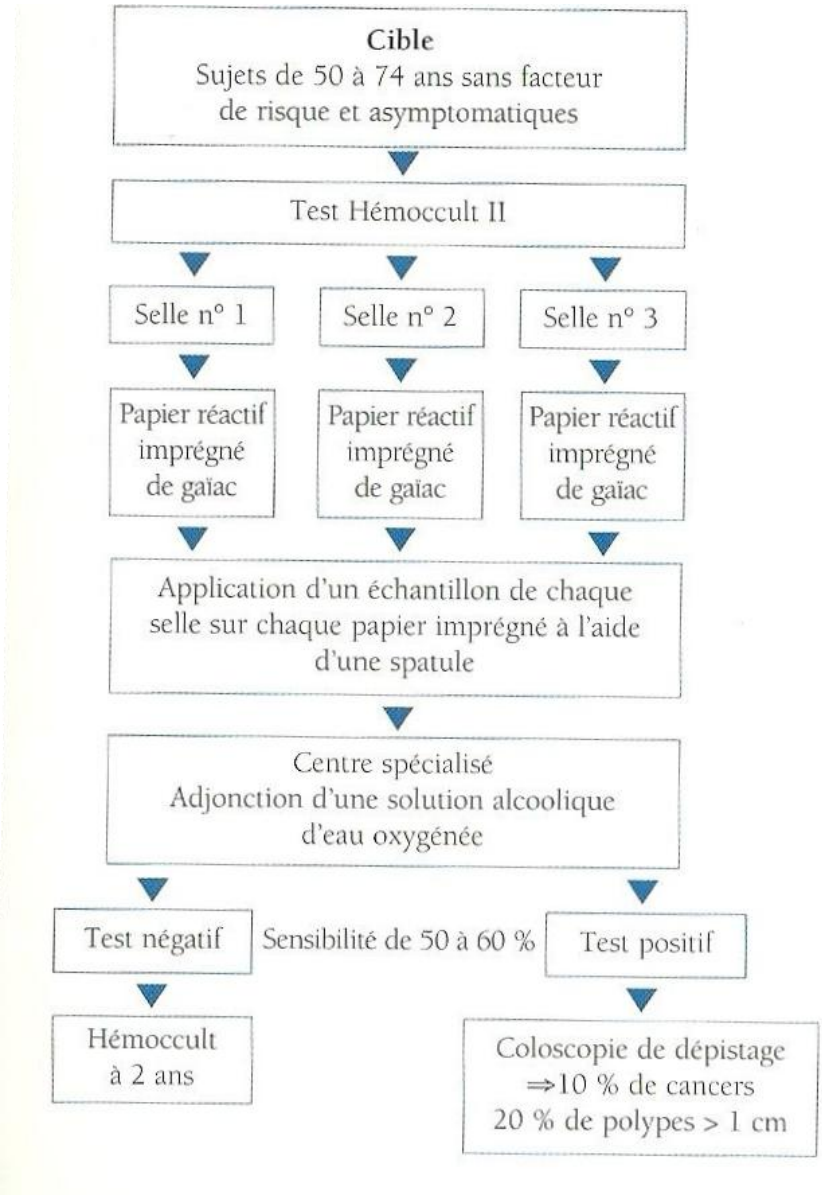

Cible
Sujets de 50 à 74 ans sans facteur de risque et asymptomatiques
Test Hémoccult II
Selle n° 1
Selle n° 2
Selle n° 3
Papier réactif imprégné de gaïac
Papier réactif imprégné de gaïac
Papier réactif imprégné de gaïac
Application d'un échantillon de chaque selle sur chaque papier imprégné à l'aide d'une spatule
Centre spécialisé
Adjonction d'une solution alcoolique d'eau oxygénée
Test négatif
Sensibilité de 50 à 60 %
Test positif
Hémoccult à 2 ans
Coloscopie de dépistage
⇒10 % de cancers
20 % de polypes > 1 cm

Figure 7: Stratégie mise en place suite au dépistage de masse du cancer colo rectal (Cancéroguide; 2007)

2. *Dépistage des populations à risques*

Les populations à risque sont exclues des campagnes de dépistage de masse.
La coloscopie est le moyen de dépistage de premier recours chez ces personnes.
Il y a 2 types de groupes à risques :

- A risque élevé quand il y a des antécédents familiaux, une maladie de Crohn ou une rectocolite hémorragique.
- A risque très élevé quand il y a une HNPCC ou une PAF.

a. Risque élevé

- **Antécédents de cancers colorectaux**

C'est-à-dire un cas au premier degré de parenté avant 60 ans ou plusieurs cas au premier degré quelque soit l'âge ou une personne atteinte d'un cancer colorectal avant 50 ans.
Dans ce groupe la coloscopie est réalisée à partir de 45 ans ou 5 ans avant l'âge du diagnostic du cas index.

- **Maladie de Crohn ou Rectocolite hémorragique**

La coloscopie est réalisée tous les 2 à 3 ans.

b. Risque très élevé

Le risque pour ces personnes est très élevé car dans 80 à 95% des cas il y a apparition d'un cancer colorectal à 70 ans.
Le dépistage est réalisé sur les membres de la famille d'un sujet très à risque

- **HNPCC**

La coloscopie est pratiquée tous les 2 ans à partir de 20-25 ans ou 5 ans avant l'âge du diagnostic le plus précoce dans la famille. Un examen gynécologique est également réalisé systématiquement à partir de 30 ans.
Une gastroscopie est pratiquée si un cancer gastrique a été diagnostiqué dans la famille ainsi qu'un examen urologique (Grangjouan, 2002).

- **PAF**

Si le patient souffre d'une PAF atténuée la coloscopie est faite tous les ans à partir de 30 ans chez les sujets apparentés (Lecomte, 2006). Une endoscopie est réalisée tous les ans à partir de 12 ans.

IV. DIAGNOSTIC

Le problème du diagnostic se pose après un dépistage positif ou si les patients présentent des symptômes intestinaux.

1. Clinique

Un examen clinique complet est effectué.
Il consiste en un examen de l'abdomen, toucher pelvien, palpation des aires ganglionnaires et évaluation de l'état général (Guide ALD HAS n°30).

Les signes d'appels d'un cancer colorectal sont :

- Saignement dans les selles
- Douleurs abdominales ne cédant pas à un traitement symptomatique
- Anémie
- Amaigrissement
- Alternance diarrhée/constipation
- Occlusion intestinale
  (www.inserm.fr/thematiques/cancer/dossier/cancer-colorectal)

2. Coloscopie

Le but du diagnostic est de révéler la présence d'anomalies prénéoplasiques. Grâce à la coloscopie, la tumeur devient visible. Un morceau de celle-ci est prélevée (biopsie) en vue d'une analyse.
A partir de cet examen une stratégie thérapeutique et un suivi adapté seront mis en place.
La coloscopie est un élément diagnostic important car elle va confirmer ou non le diagnostic (www.e-cancer.fr).
Dans 30% des cas la coloscopie détecte un polype qui peut être retiré évitant ainsi qu'il ne devienne cancéreux un jour. Un cancer est découvert dans 10% des cas (INCa, 2008).

3. Autres examens

Ceux-ci permettent de voir une éventuelle extension.

a. Examen biologique

Il consiste en un dosage des ACE (Antigène Carcino-embryonnaire), fait systématiquement lors du bilan initial d'un cancer colorectal.
Evaluation de la fonction rénale (clairance à la créatinine), hépatique.
Dosage des plaquettes, NFS (Numération Formule Sanguine) et bilan lipidique (LDH (Lactate deshydrogénase)).

b. Imagerie

Le bilan initial prévoit une échographie hépatique et une radiographie pulmonaire ou un scanner thoraco-abdo-pelevien. L'imagerie va permette de localiser les métastases.

c. Classifications

Si le diagnostic de cancer est posé, le praticien va évaluer l'extension ou non de la maladie grâce à toutes ces analyses.
A partir de là, la tumeur sera classée à un certain stade et une stratégie thérapeutique adaptée sera mise en place.

Plusieurs extensions sont évaluées:

- Extension locorégionale. C'est à dire en profondeur au sein de l'épithélium et si l'extension affecte des organes environnant.
- Extension lymphatique. Il est possible que les ganglions péri coliques ou péri rectaux soient affectés. Les ganglions à distances du colon et du rectum sont également analysés.
- Extension métastatiques. Une métastase est une tumeur maligne secondaire issue d'un cancer primitif. Les métastases pulmonaires et hépatiques sont fréquentes. Mais l'os et le cerveau peuvent également être touchés. Si la présence de métastases est

avérée, leurs traitements sont laissés à l'évaluation du praticien. En effet, il devra se poser la question de savoir si leurs traitements sont indispensables, et quelles en seront les conséquences pour le patient.

Deux classifications existent :

- TNM (figure 8).
- STADE (figure 9).

Tumeur primitive (T)	
Tis	Carcinome in situ : tumeur intra-épithéliale ou envahissant la lamina propria (intra-muqueuse) sans extension à la sous-muqueuse à travers la muscularis mucosae
T1	La tumeur envahit la sous-muqueuse sans la dépasser
T2	La tumeur envahit la musculeuse sans la dépasser
T3	La tumeur envahit, à travers la musculeuse, la sous-séreuse (sans atteinte du revêtement mésothélial) et le tissu péricolique non péritonéalisé ou le tissu périrectal
T4	La tumeur perfore le péritoine viscéral et/ou envahit les organes de voisinage
Ganglions régionaux* (N) *[*Si les ganglions lymphatiques examinés sont négatifs, mais que le nombre habituellement réséqué n'est pas atteint, classer pN0]*	
N0	Pas d'adénopathie régionale métastatique
N1	1 à 3 adénopathies régionales métastatiques
N2	4 ou plus adénopathies régionales métastatiques
Nx	Les adénopathies régionales ne peuvent être évaluées
	Nombre minimum de ganglions examinés : 12
Métastases (M)	
M0	Absence de métastase
M1	Métastases à distance (l'atteinte des ganglions iliaques externes ou iliaques communs de même que l'atteinte des ganglions non régionaux est considérée comme M1)
Mx	Statut métastatique inconnu

Figure 8: Classification TNM (référentiel Oncolor, Carol et Oncolie, 2009).

	TNM		
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade I	T1 T2	N0 N0	M0 M0
Stade II			
Stade IIa	T3	N0	M0
Stade IIb	T4	N0	M0
Stade III			
Stade IIIa	T1-T2	N1	M0
Stade IIIb	T3-T4	N1	M0
Stade IIIc	Tx	N2	M0
Stade IV	Tous T	Tous N	M1

Figure 9: Classification en stade (référentiel Oncolor, Carol et Oncolie, 2009).

V. LES TRAITEMENTS

Le traitement est défini en accord avec le patient.
Il va dépendre de la localisation, du stade, de l'histologie et de l'état général du patient.

Différents traitements sont mis en place, selon l'objectif visé qui est:

- Soit un traitement curatif
- Soit un traitement palliatif

Le traitement choisit doit permettre d'éviter les complications et de préserver la qualité de vie du patient.
Si le cancer est limité au colon ou rectum et qu'il n'y a pas de métastase ni d'envahissement ganglionnaire, la chirurgie est pratiquée pour retirer la partie atteinte. La chimiothérapie est effectuée si la tumeur est agressive.

Si des cellules cancéreuses ont atteints un ou plusieurs ganglions lymphatiques proches du côlon et qu'il n'y a pas de métastases, la chirurgie sera complétée d'une chimiothérapie adjuvante.
Enfin si le cancer a atteints d'autres organes, deux chirurgies peuvent être réalisées. Une pour la tumeur primitive et une pour les métastases. La chimiothérapie est réalisée soit entre les deux chirurgies soit en traitement principal si la chirurgie n'est pas envisageable. (INCa, 2010)

1. Chirurgie

C'est la résection colique et le curage ganglionnaire.
La chirurgie est l'indication première pour les formes compliquées (occlusion ou perforation) ou s'il y a des métastases (Référentiel Oncolor, Carol et Oncolie, 2009).

2. Radiothérapie

Ce n'est pas une indication de routine.
La radiothérapie consiste en l'administration de la dose minimale efficace de rayons sur les zones à traiter en épargnant les tissus sains environnant. Elle est utilisée pour un cancer du rectum.

3. Chimiothérapie

a. Cancer colorectal non métastatique

Le patient peut-être opéré si la tumeur n'est pas très étendue. On parle alors de résection chirurgicale où une partie du côlon ou du rectum sera retirée. A cette résection est associé un curage ganglionnaire (tableau 1).

Tableau 1 : Traitement selon le stade du cancer colorectal ((réf Oncolor, Carol et Oncolie, 2009)

Stade I	Chirurgie seule (résection chirurgical et curage ganglionnaire)
Stade II	La chimiothérapie adjuvante n'est pas recommandée s'il n'y a pas de facteur de mauvais pronostic. La chirurgie seule est recommandée.
Stade III	La chimiothérapie adjuvante est recommandée.

Les stades I et II d'un cancer du rectum peuvent être traités par radiothérapie endoréctale ou par chirurgie.
Comme vu dans le tableau précédent, la chimiothérapie adjuvante est préconisée pour le stade II à facteurs de risque associés ou au stade III de la maladie. Les molécules utilisées sont décrites dans le tableau 2.

Tableau 2 : Protocole de chimiothérapie utilisé en fonction du stade de la maladie (référentiel Oncolor, Carol et Oncolie, 2009)

Chimiothérapie de Stade II	**Chimiothérapie de stade III**
Acide folinique/5-FU en 12 cycles= LV5FU2 Acide folinique/5-FU en 6 cycles= FUFOL 5-FU en continu Acide folinique/5-FU/Oxaliplatine= FOLFOX	FOLFOX Capécitabine LV5FU2 5-FU FUFOL

b. Cancer métastatique

La chimiothérapie et la chirurgie dans un second temps sont à envisager pour tous les patients. Les bénéfices et les effets indésirables devront être discutés avec le patient.

- Métastases métachrones

Un bilan de résecabilité est réalisé par coloscopie, TDM thoraco-abdo-pelvien ou par morpho-TEP. Si la tumeur est résecable, la chirurgie peut être réalisée dans un premier temps puis pourra intervenir la chimiothérapie adjuvante ou inversement. Dans le cas d'une tumeur non résecable, la chimiothérapie est commencée le plus tôt possible suivi d'une évaluation du traitement (figure 10).

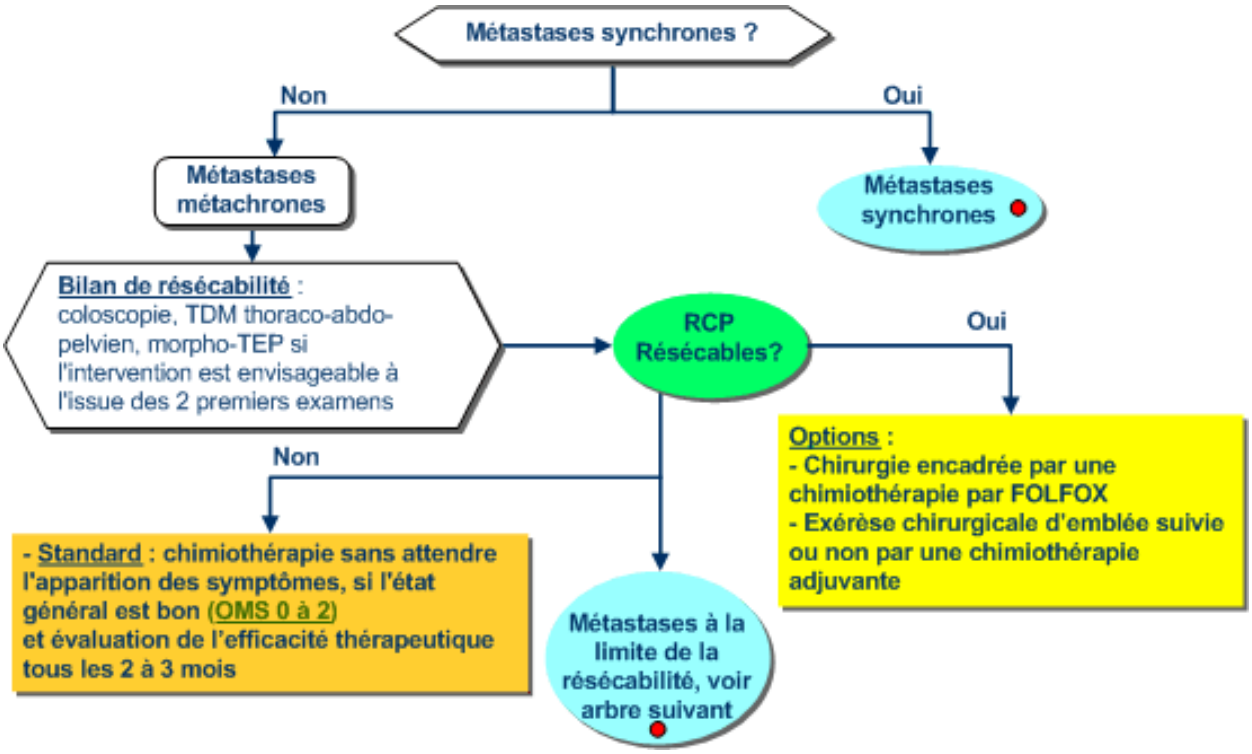

Métastases synchrones ?
Non
Oui
Métastases métachrones
Métastases synchrones
Bilan de résécabilité : coloscopie, TDM thoraco-abdo-pelvien, morpho-TEP si l'intervention est envisageable à l'issue des 2 premiers examens
RCP Résécables?
Oui
Options :
- Chirurgie encadrée par une chimiothérapie par FOLFOX
- Exérèse chirurgicale d'emblée suivie ou non par une chimiothérapie adjuvante
Non
- Standard : chimiothérapie sans attendre l'apparition des symptômes, si l'état général est bon (OMS 0 à 2)
et évaluation de l'efficacité thérapeutique tous les 2 à 3 mois
Métastases à la limite de la résécabilité, voir arbre suivant

Figure 10: Arbre décisionnel dans le cas de métastases métachrones. (Référentiel Oncolor, Carol et Oncolie, 2009)

-Métastases synchrones

Un bilan de résecabilité est également effectué. La tumeur opérable est retirée de suite ou ultérieurement.

Plusieurs schémas thérapeutiques sont possibles :

- Chirurgie de la tumeur primitive et des métastases au cours de la même opération.
- Chirurgie de la tumeur suivie d'une chimiothérapie et chirurgie des métastases.

Dans tous les cas une chimiothérapie adjuvante peut-être envisagée.

Les métastases synchrones non résecables demandent l'évaluation du statut KRAS. Une chimiothérapie est réalisée avec réévaluation de l'opérabilité au bout de 2-3 mois (figure 11). Le tableau 3 résume les molécules utilisées.

Tableau 3 : Molécules utilisées dans le cancer colorectal métastasique. (réf Oncolor, Carol et Oncolie, 2009)

Métastases opérables	FOLFOX
Métastases potentiellement resécables	FOLFOX-Bévacizumab FOLFIRI-Bévacizumab FOLFOXIRI FOLFOX-Cétuximab FOLFIRI-Cétuximab FOLFIRINOR FOLFIRI-Bevacizumab
Métastases inopérables ou plusieurs sites métastasiques (palliatifs)	FOLFIRI-Cétuximab FOLFOXIRI FOLFOX-Cétuximab FOLFOX 4 ou FOLFOX 7 XELOX FOLFIRI LV5FU2 Capécitabine XELIRI
Contre-indication au 5-FU	IRINOX TOMOX

Une réévaluation du traitement au bout de 2-3 mois est systématiquement réalisée.

Cette réévaluation sera suivie soit d'un changement de thérapeutique (le panitumumab a l'AMM en traitement de 2ème ligne) soit d'une chirurgie.

La progression sous 5-FU, irinotécan, oxaliplatine, cétuximab et panitumumab entraine l'entrée en soins palliatif après accord du patient (Référentiel Oncolor, Carol et Oncolie, 2009).

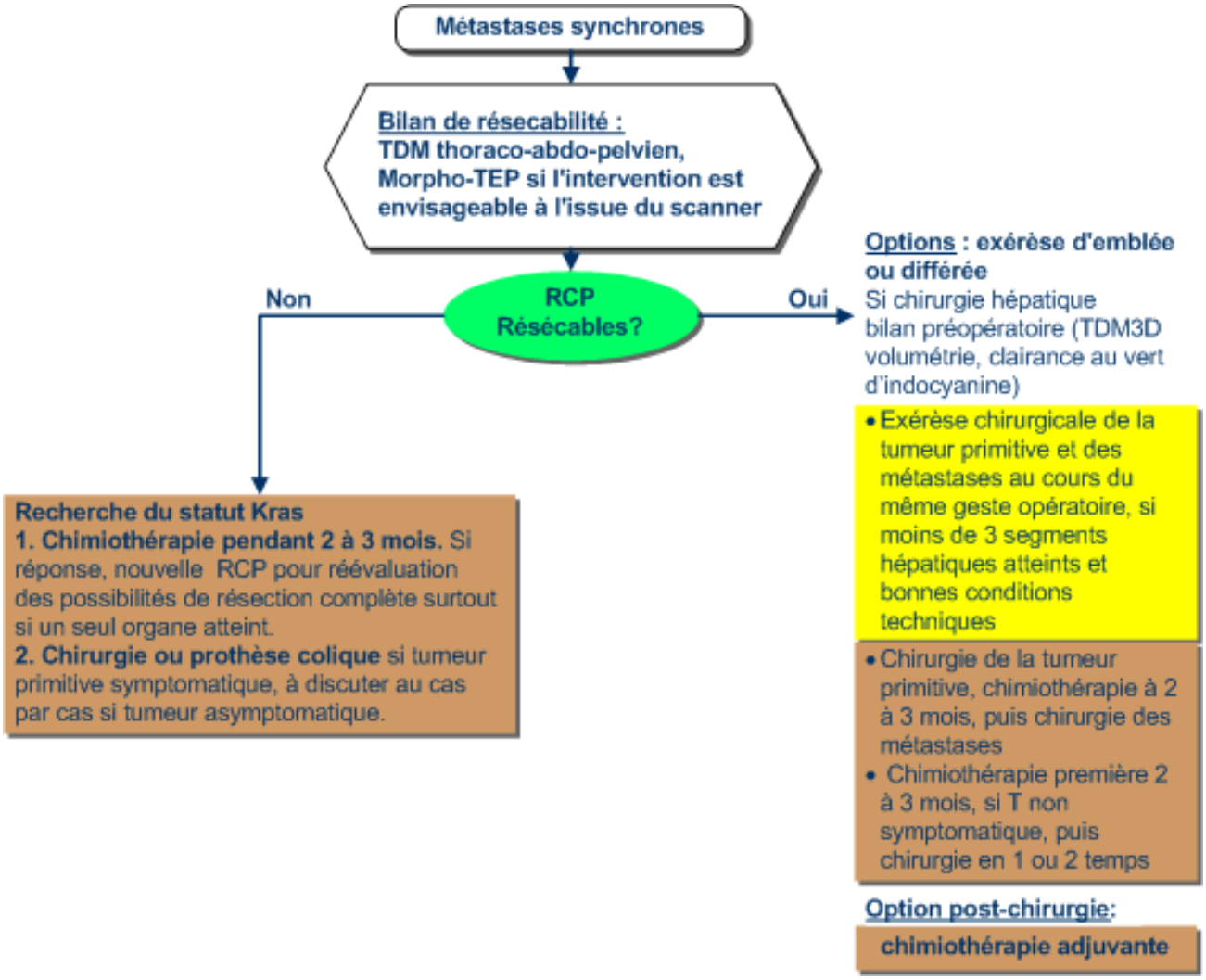

Métastases synchrones
Bilan de résecabilité :
TDM thoraco-abdo-pelvien,
Morpho-TEP si l'intervention est envisageable à l'issue du scanner
RCP
Résécables?
Non
Oui
Options : exérèse d'emblée ou différée
Si chirurgie hépatique bilan préopératoire (TDM3D volumétrie, clairance au vert d'indocyanine)
• Exérèse chirurgicale de la tumeur primitive et des métastases au cours du même geste opératoire, si moins de 3 segments hépatiques atteints et bonnes conditions techniques
• Chirurgie de la tumeur primitive, chimiothérapie à 2 à 3 mois, puis chirurgie des métastases
• Chimiothérapie première 2 à 3 mois, si T non symptomatique, puis chirurgie en 1 ou 2 temps
Option post-chirurgie:
chimiothérapie adjuvante
Recherche du statut Kras
1. Chimiothérapie pendant 2 à 3 mois. Si réponse, nouvelle RCP pour réévaluation des possibilités de résection complète surtout si un seul organe atteint.
2. Chirurgie ou prothèse colique si tumeur primitive symptomatique, à discuter au cas par cas si tumeur asymptomatique.

Figure 11: Arbre décisionnel dans le cadre de métastases synchrones (Référentiel Oncolor, Carol et Oncolie, 2009)

c. Evaluation de la chimiothérapie

L'efficacité du traitement est évaluée sur le plan clinique et sur l'imagerie après 3 mois de traitement.
Si le traitement a été efficace et que la taille de la tumeur a diminuée, la chirurgie est alors envisageable. Si malgré le traitement la tumeur a progressée, il faut changer de protocole.

d. Surveillance de la chimiothérapie

Avant chaque cycle de chimiothérapie, un bilan standard est effectué.
Il comprend :

- Examen clinique (état général, infection)
- Hémogramme pour rechercher une neutropénie, une anémie ou une thrombopénie
- Examens complémentaires basés sur l'évaluation de la fonction rénale et hépatique.

En fonction de ces résultats, la cure peut être reportée.

e. Effets indésirables

Les molécules utilisées en chimiothérapie vont agir sur la tumeur mais également sur les cellules saines. Il en découle des effets indésirables qui peuvent affecter la qualité de vie du patient et entrainer dans certain cas l'arrêt du protocole de chimiothérapie (tableau 4).

Les effets indésirables observés dépendent des molécules utilisées :

Tableau 4 : Effets indésirables de molécules utilisées en chimiothérapie et prévention

	Molécules en cause	**Prévention**
Nausées, vomissements, diarrhée	Oxaliplatine, 5-fluoro-uracile	Protocole anti-émétique, lopéramide
Mycose buccale	5-fluoro-uracile	Remise en état de la dentition et bains de bouche.
Troubles neurosensoriels	Oxaliplatine, 5-fluoro-uracile	
Alopécie	Irinotécan, panitumumab	Port de casque réfrigérant. Réversible
Insuffisance rénale	Oxaplatine, oxaliplatine, raltitrexed	Hyperhydratation avant et après la chimiothérapie
Rash	Oxaliplatine, Cétuximab, Panitumumab	Emollients, éviction solaire, toilette avec un pain dermatologique
Hypertension artérielle	Bevacizumab	Surveillance tensionnelle
Hématologie	Oxaliplatine	Erythopoïétine, G-CSF, fer, transfusion
Oculaire, auditif	Oxaliplatine, panitumumab	Hydratation occulaire

VI. SURVEILLANCE

Après un traitement curatif, il faut pouvoir :

- Déceler les récidives
- Traiter les complications
- Prendre en charges les séquelles
- Faciliter la réinsertion socioprofessionnelle

PARTIE II :

Les thérapies ciblées
Anti-EGFR.

I. QU'EST-CE-QUE L'EGFR

1. Structure

EGFR ou Epidermal Growth Factor Réceptor est une glycoprotéine transmembranaire de 170 kDA présente à la surface des cellules. Il appartient à la famille des HER. Les récepteurs HER sont composés d'une portion extracellulaire avec un domaine de glycosylation du ligand, d'un domaine transmembranaire et d'une région intracellulaire à activité tyrosine kinase (figure 12).

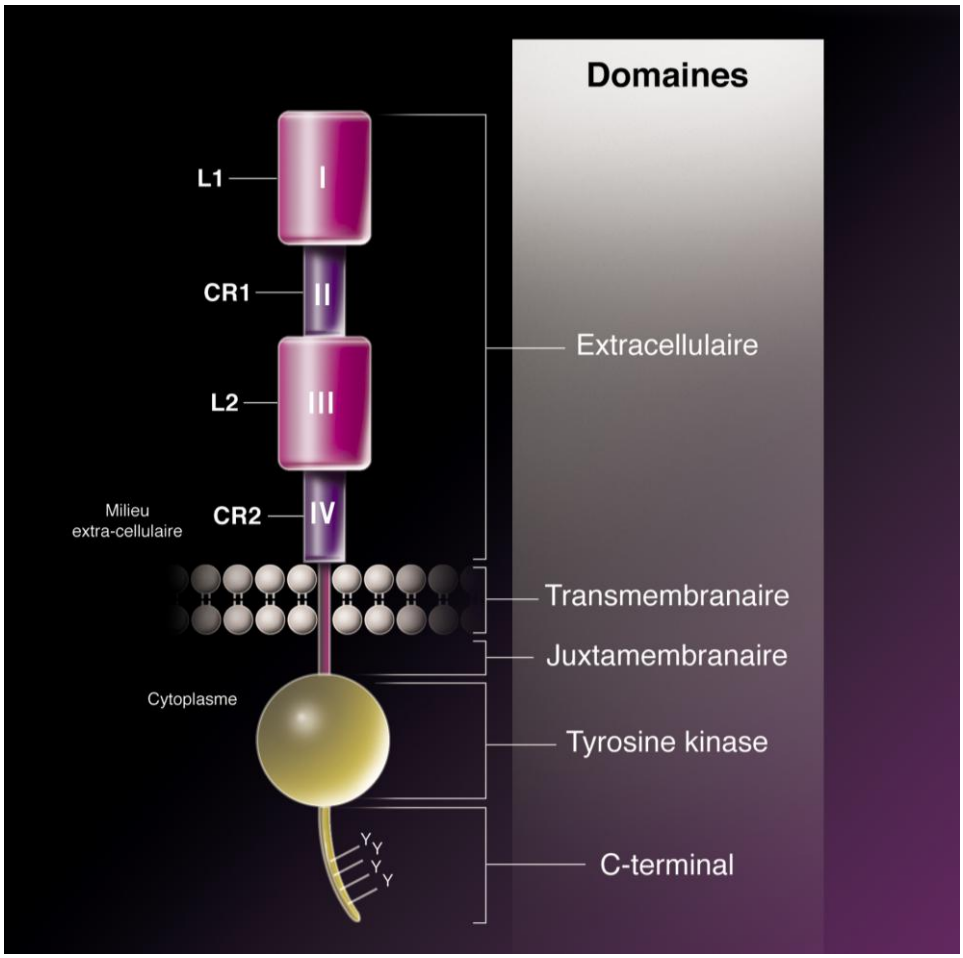


Figure 12 : Structure du récepteur à l'EGF.

L'EGFR est un monomère sous forme inactive. Il se dimérise quand il est activé par un ligand. (Wells, 1999).
Les récepteurs HER sont composés de 4 membres :

- ErbB1=EGFR à activité tyrosine kinase
- ErbB2=HER2 à activité tyrosine kinase
- ErbB3=HER2 dépourvue d'activité tyrosine kinase
- ErbB4=HER4 à activité tyrosine kinase

Chaque membre fixe un ligand différent.

2. Localisation

EGFR est exprimé au niveau des cellules épithéliales de la peau, foie, intestin, poumon, pancréas.
Son expression normale est de 40000 à 100000 récepteurs/cellule.

3. Ligand

Les ligands capables de fixer EGFR sont (figure 13) :

- EGF
- Héparin-binding EGF
- TGF-alpha
- Amphiréguline
- Bétacelluline
- Epiréguline

(Jost, 2000)

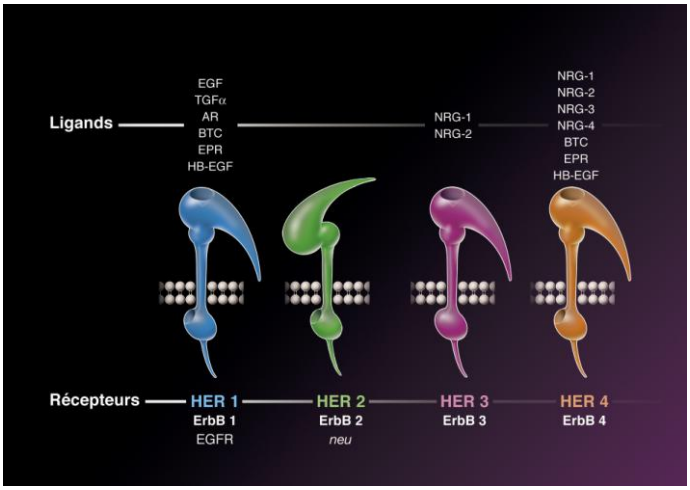


Figure 13 : Les ligands de récepteurs HER

4. Mécanisme d'action

Quand le ligand se fixe sur le récepteur, celui-ci se dimérise. L'internalisation du complexe récepteur/ligand intervient suivi de l'autophosphorylation de la Tk intracellulaire.
La transduction du signal en intracellulaire est activée (figure 14). Elle est essentiellement assurée par 2 voies :

- Ras-raf-MEK-ERK (voie des MAP kinase)
- PI3K/PTEN/AKT

(Herbst, 2002)

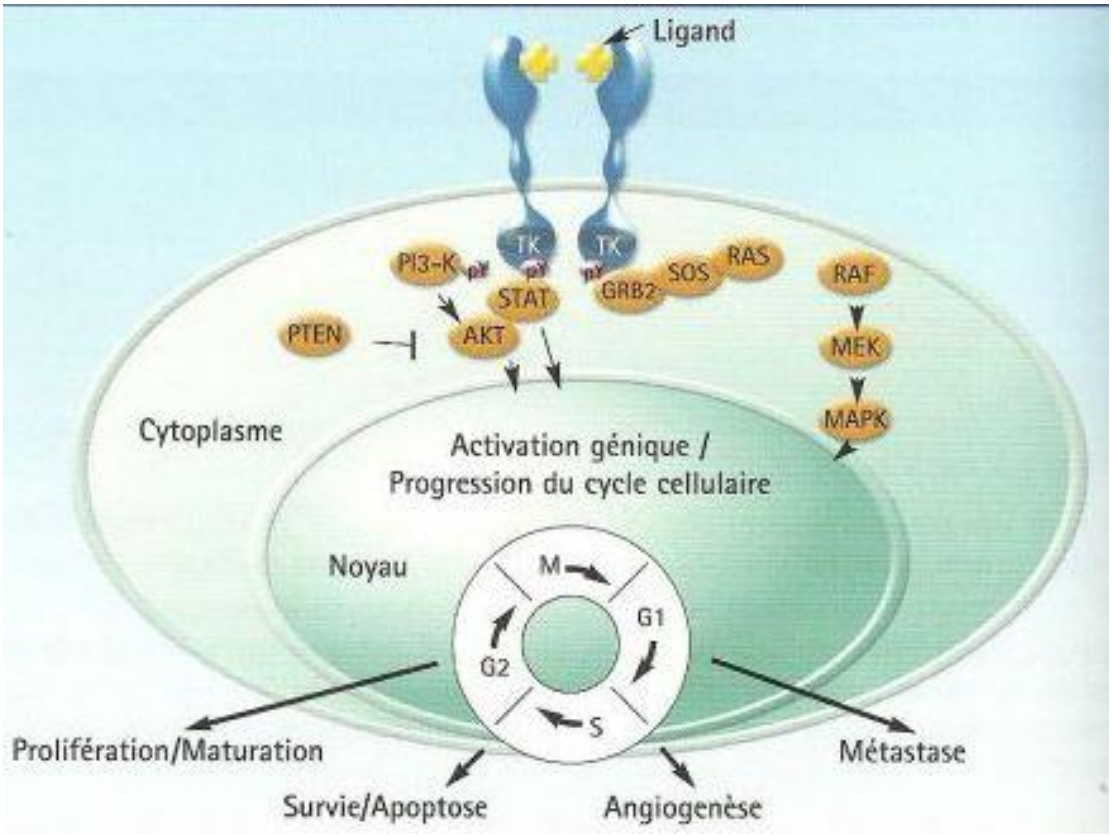


Figure 14 : Représentation des 2 voies principales de signalisation cellulaire (Cahier scientifique Merck).

5. Rôle

L'activation de l'EGFR entraine:

- L'angiogénèse (l'activation de l'EGFR entraine la production de VEGF)
- L'apoptose
- La prolifération cellulaire
- La différenciation cellulaire

(Ciardiello, 2001 et Jost, 2000)

6. Inhibition de l'EGFR

L'inhibition du récepteur à l'EGF peut être réalisée par : (Kaufman, 2008)

- Anticorps monoclonaux de type Ig G qui vont bloquer la progression du cycle et induire l'apoptose (cétuximab, paniytumumab).
- Petites molécules qui vont inhiber l'activité tyrosine kinase (Tarceva, Iressa, Glivec).
- Vaccin anti EGFR
- Oligonucléotides anti sens
- Immunoconjugué (EGF+ genistéine qui est un composant du soja) (Gentile, 2003)
- Toxine : l'EGF est fusionné à une toxine comme celle du Pseudomonas aeruginosa (Ciardiello, 2000)

Mais d'après les nombreuses études réalisées, les anticorps monoclonaux et les molécules anti-tyrosine kinase sont les moyens d'inhibition de l'EGFR les plus utilisées (Ciardiello, 2000).
Dans le cancer du côlon et du rectum métastatique, les molécules ayant l'AMM sont les anti-EGFR.

7. EGFR au niveau de la cellule tumorale

Le récepteur est surexprimé dans de nombreux types de cancers tels que le cancer colorectal, le cancer bronchique non à petites cellules et le cancer épidermoïde de la tête et du cou.
Le cancer colorectal surexprime l'EGFR dans 60 à 80% des cas (figure 15).

Cancer colorectal	*60-80%*
Carcinome épidermoïde de la tête et du cou	*95-100%*
Cancer du poumon	*40-80%*
Cancer du sein	*14-91%*
Cancer de l'ovaire	*35-70%*
Cancer du rein	*50-90%*

Figure 15: Expression de l'EGFR dans différents types de cancer.

Au niveau des cellules normales l'activité de l'EGFR est parfaitement contrôlée. Ce n'est plus le cas dans les cellules tumorales où il est surexprimé (>100000), le récepteur est dimérisé et l'activité tyrosine kinase provoque en permanence la phosphorylation de la tyrosine.

Cette surexpression entraine pour la cellule tumorale :

- Une inhibition de l'apoptose
- L'angiogénèse pour la croissance de la tumeur et des métastases par apport d'oxygène et des nutriments.
- La motilité de la tumeur
- Métastase

La surexpression du récepteur n'est pas le seul mécanisme observé au niveau de la cellule tumorale. En effet, on remarque également qu'il y a une augmentation de la concentration des ligands, une diminution de l'activité de la phosphatase inhibant l'activité Tk donc de PTEN, une diminution du turnover du récepteur et une mutation de l'EGFR.

II. RAPPEL SUR LES ANTICORPS MONOCLONAUX

Les anticorps (Ac) sont des immunoglobulines (Ig) fabriquées par le système immunitaire, capable de reconnaître et de se fixer sur une structure chimique complémentaire de la leur, appelée antigène (Ag).
Nous n'étudierons ici que les anticorps monoclonaux anti-EGFR utilisés dans le traitement des cancers colorectaux : cétuximab (Erbitux®) et panitumumab (Vectibix®).
Ce sont des anticorps de type IgG1 pour le cétuximab et IgG2 pour le panitumumab.

1. Structure

Tous les Ac sont des protéines.

Les Ac ont 3 segments :

- 2 segments Fab (Fragment Antibody Binding)
- 1 segment Fc (Fragment Constant)

Le segment Fab est une structure variable d'un Ac à l'autre. Il est complémentaire de l'Ag.
Le segment Fc est identique pour tous les Ac d'une même espèce. Il se fixe sur des récepteurs membranaires au niveau des cellules immunitaires.

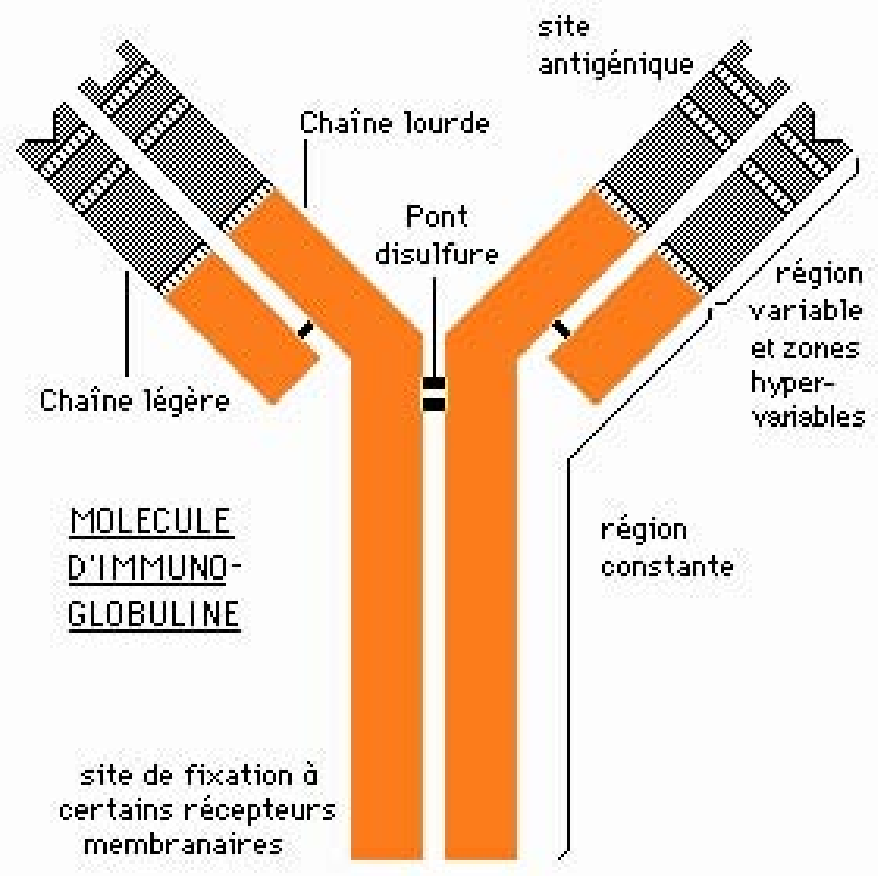


Figure 16: Structure de base d'un anticorps.

Chaque Ac est composé de 2 chaînes légères identiques (L ou Light) et de 2 chaînes lourdes identiques (H ou Heavy).
Les 2 chaînes lourdes sont liées entre elles par des ponts disulfures et chaque chaîne lourde est liée par un pont disulfure à une chaine légère (figure 16) (Alzari, 1988).
Au niveau des chaînes L, il existe 2 domaines : VL et CL et pour la chaîne H il y a un domaine VH et plusieurs domaines CH.
Sur les domaines VH et VL se trouvent les CDR (Complementary Determining Region) (figure 17).Ce sont des zones hypervariables .Ces zones sont séparées par des régions charpentes, FR (Framework), qui sont des zones plus conservées.
CDR et FR forment le paratope reconnaissant l'Ag.

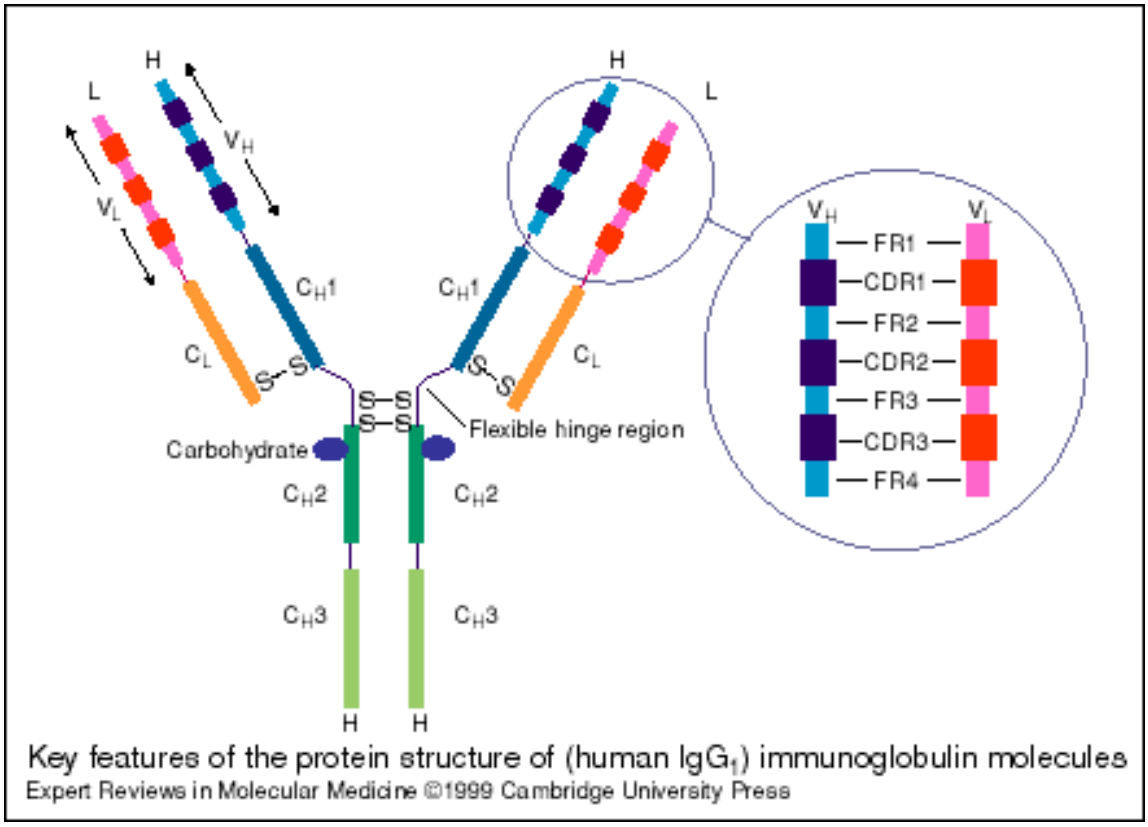


Figure 17: Les différents domaines d'un anticorps.

2. *Liaison Ag-Ac*

Lorsque l'Ac se fixe à l'Ag (figure 18), la combinaison des deux forme un immun complexe.

L'interaction Ag/Ac implique plusieurs types de forces (Novotny, 1992):

- Electrostatique
- Hydrogène
- Van der Walls
- Hydrophobe

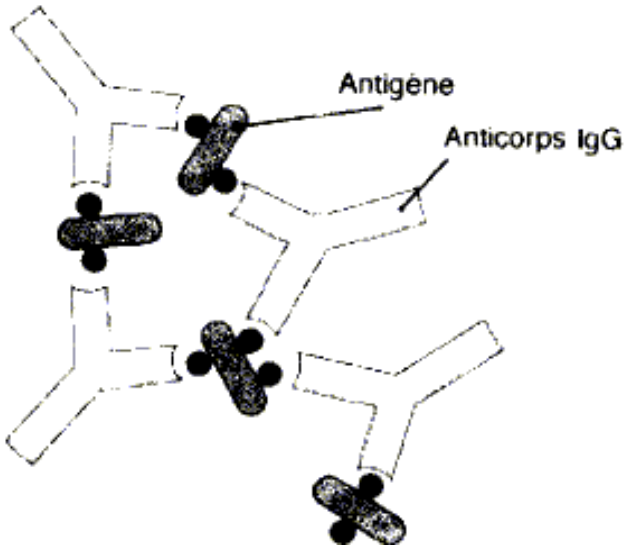


Figure 18: Représentation de l'interaction antigène-anticorps.

3. Action

Les Ac permettent la destruction des Ag. Notamment après avoir fixé par le Fc la cellule immunitaire, les Ac par le Fab peuvent fixer l'Ag.
La formation de l'immun complexe à la surface de la cellule immunitaire destructrice va déclencher une série d'action conduisant à l'élimination de l'Ag.
Parmi ces actions, il ya l'ADCC et la destruction de l'Ag par le complément.

a. ADCC

L'Ac se fixe sur la cellule à détruire. La cellule NK (Natural Killer) va fixer l'Ac grâce aux récepteurs pour le Fc à sa surface (FcɣRIII). A partir de là, l'attaque cytotoxique par le NK est déclenchée.
La cellule NK contient dans son cytoplasme des enzymes (perforine et granzyme). Ces enzymes sont libérées en présence de l'Ag et vont entrainer la perméabilité de l'Ag et conduire à sa destruction (figure 19) (Lanier, 1986).

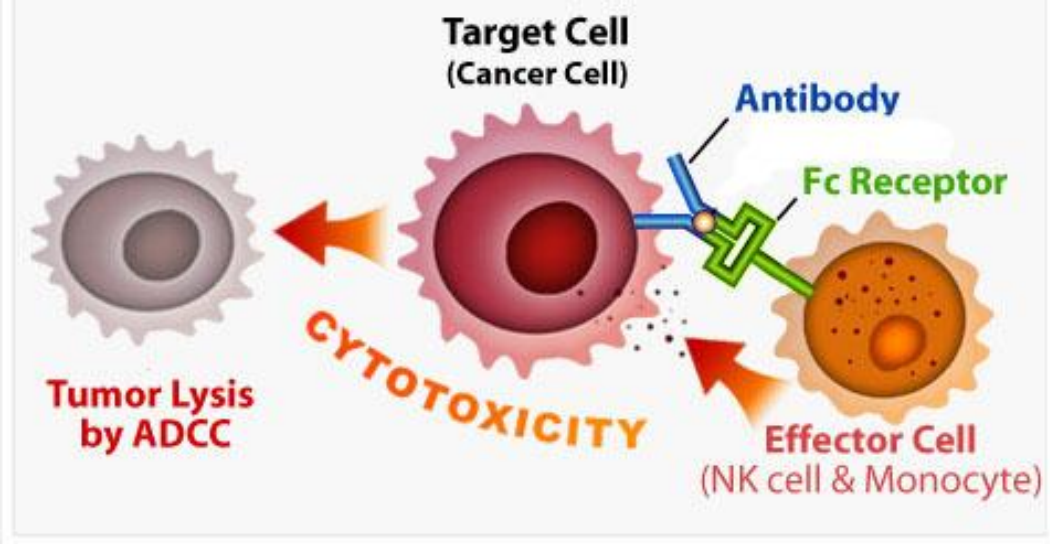


Figure 19: Mécanisme de l'ADCC

b. Lyse cellulaire par le complément

Le complément circule sous forme d'un complexe protéique inactif dans le plasma. La fixation de l'Ig G sur l'Ag va permettre d'activer le complément qui se fixera sur l'Ac. C'est la voie classique d'activation du complément. Une cascade de réactions s'ensuit pour permettre la lyse des protéines du complément et donc leur activation (Esser, 1991) (figure 20).

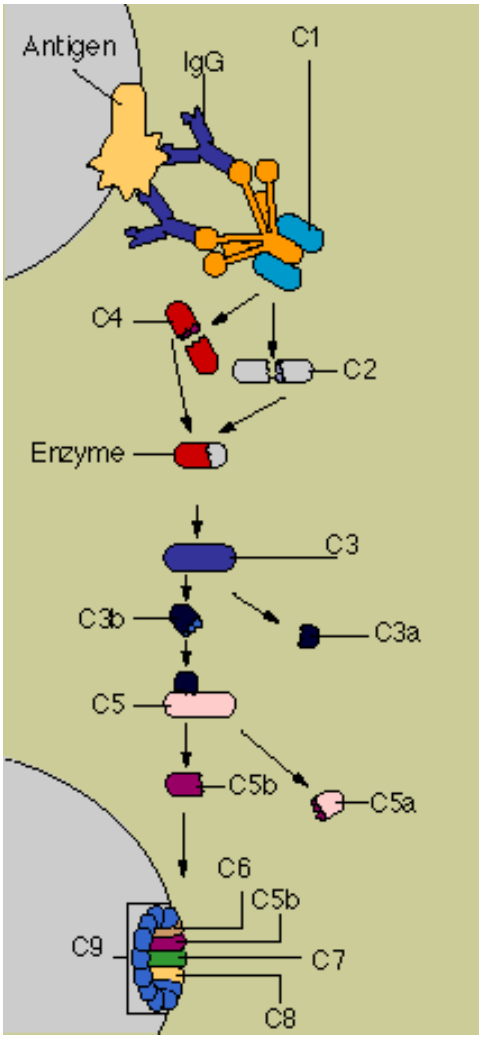


Figure 20: Les différentes étapes de l'activation du complément.

Les dernières protéines activées du complément (C6, C7, C8 et C9) forme le CAM (complexe d'attaque membranaire) (figure 20) formant un pore dans la membrane de l'Ag entrainant ainsi sa destruction.

4. Fabrication

En 1975, Kohler et Milstein inventent une technique qui permet la production en quantité importante d'Ac monoclonaux (figure 21). Les anticorps monoclonaux sont capables de reconnaître un seul type de motif antigénique.

Méthode :

1. Injection de l'Ag d'intérêt chez un rongeur
2. Immunisation de celui-ci et production de lymphocytes B contre l'Ag injecté
3. Prélèvement des lymphocytes B
4. Ajout de cellules tumorales pour former un hybridome
5. Multiplication de l'hybridome et production de l'Ac recherché en quantité

Or, les Ac monoclonaux provenant d'un rongeur, ont un fragment Fc spécifique de leur espèce et donc différent de l'homme.
Injectés chez l'homme, ces Ac seront rapidement détruits car reconnus comme non soi.
Il a donc fallut les perfectionner pour leur application en thérapeutique humaine.

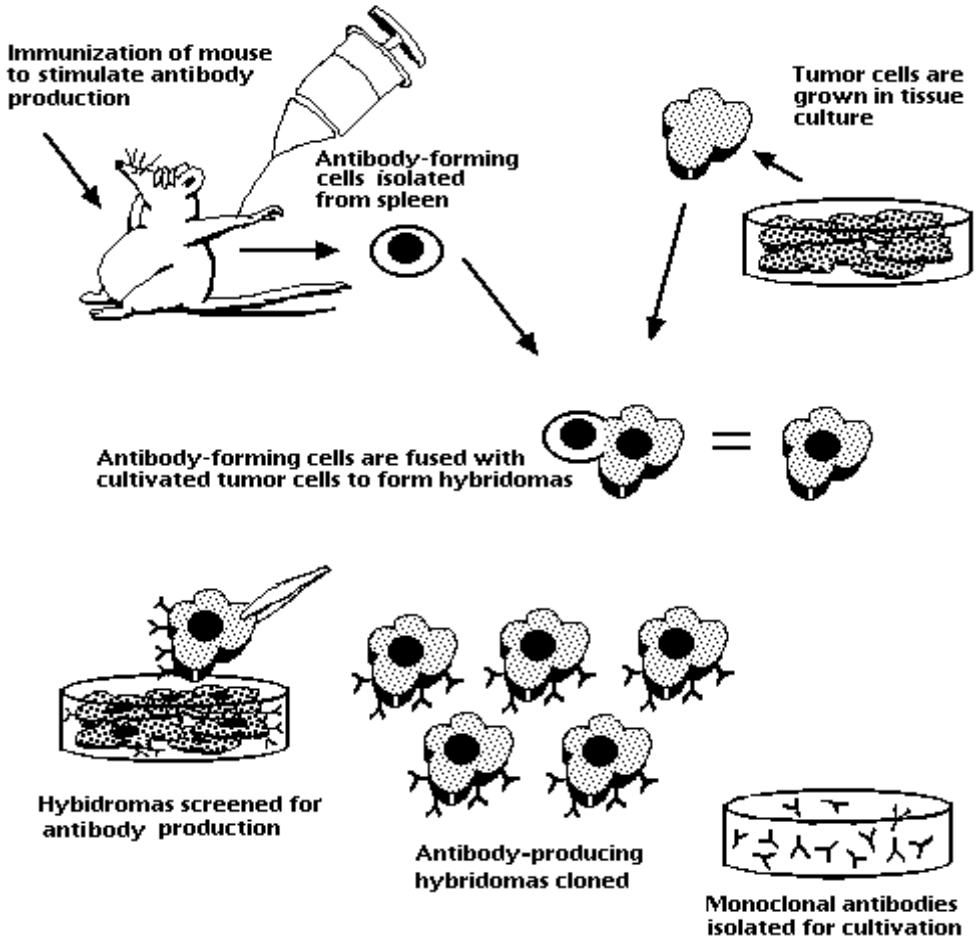

Immunization of mouse to stimulate antibody production
Antibody-forming cells isolated from spleen
Tumor cells are grown in tissue culture
Antibody-forming cells are fused with cultivated tumor cells to form hybridomas
Hybidromas screened for antibody production
Antibody-producing hybridomas cloned
Monoclonal antibodies isolated for cultivation

Figure 21: La production des anticorps monoclonaux.

Les Ac monoclonaux ont une nomenclature spécifique qui permet de connaître leur origine.
Tous les anticorps monoclonaux finissent par *-mab*. La syllabe juste avant le *–mab* définit la source (figure 22).

Si la terminaison est :

- *-umab* : c'est un Ac monoclonal humain
- *-zumab* : c'est un Ac monoclonal humanisé
- *-ximab* : c'est un Ac monoclonal chimérique
- *-momab* : c'est un Ac monoclonal murin

La pathologie est identifiée par la syllabe avant la source par *-tu* pour tumeur. (USAN)

Un anticorps chimérique est caractérisé par un Fab murin et un Fc humain. C'est le cas du cétuximab.
Un anticorps humanisé se caractérise par la présence de régions hypervariables de souris ou de rat à la place de celles humaines. C'est le bévacizumab.
Un anticorps humain n'a aucun domaine murin. C'est le panitumumab.

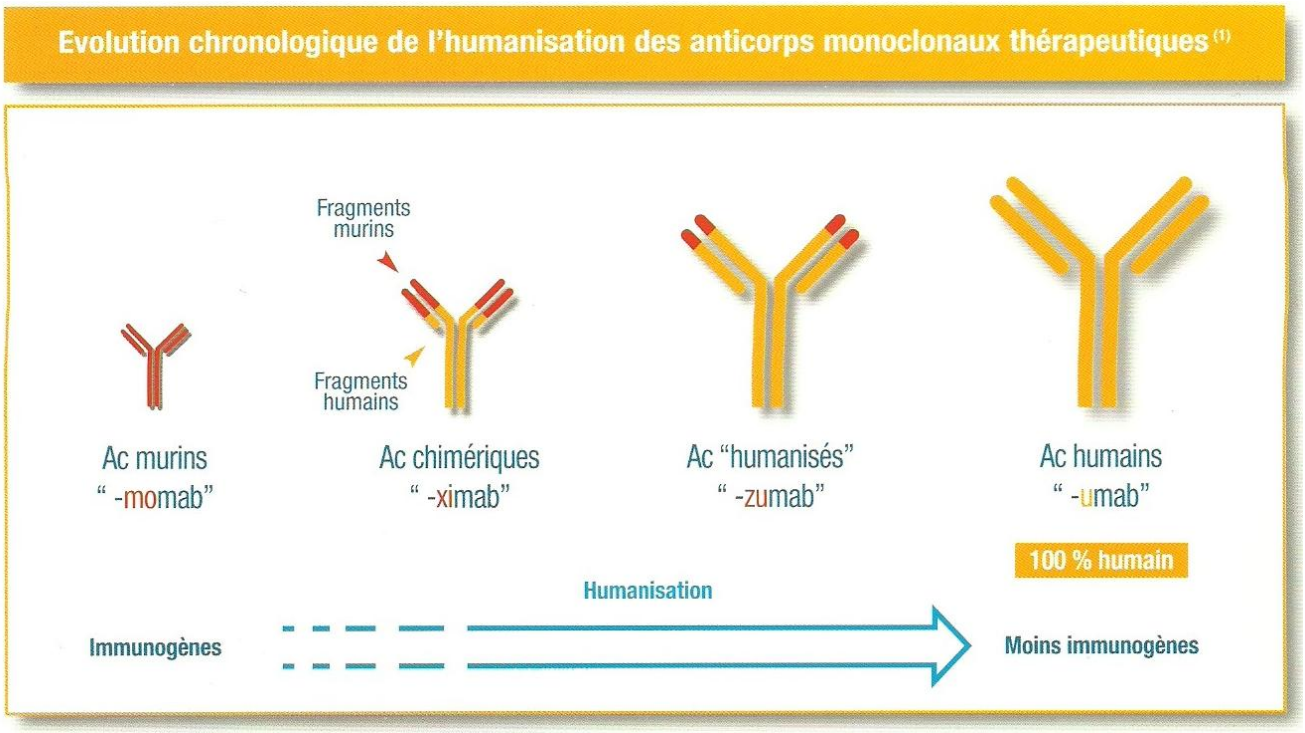


Figure 22 : Evolution chronologique des anticorps monoclonaux (Prin-Mathieu, 2003)

III. CÉTUXIMAB (ERBITIX®)

1. Présentation

Erbitux® ou cétuximab est un anticorps monoclonal présenté sous forme d'une solution stérile pour perfusion intra veineuse à la concentration de 5mg/ ml.

2. Structure

Le cetuximab est un Ac monoclonal chimérique de la sous classe des immunoglobulines G de type I.
Il est dirigé contre l'EGFR humain.
Sa structure de base est identique à tous les Ac, c'est-à-dire qu'il est composé de liaisons covalentes et non covalentes et de 4 chaines polypeptidiques :

- 2 lourdes de 449 acides aminés chacune
- 2 légères de 214 acides aminés chacune

3. Mode d'administration

C'est une solution stérile à administrer par voie Intraveineuse à l'aide d'une :

- Seringue électrique
- Pompe à perfusion
- Perfusion par gravité à débit régulé

Il est soit prêt à l'emploi ou a diluer dans du Nacl à 9g/l. Aucun autre diluant ne doit être utilisé.

4. Pharmacodynamie

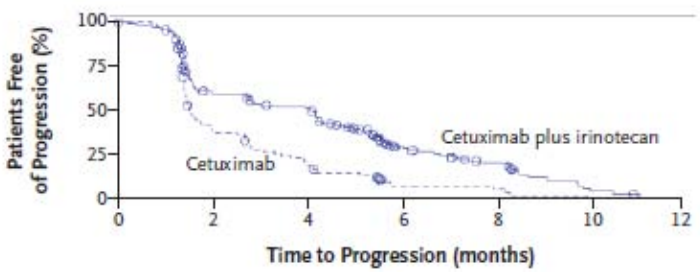
Grâce à sa fraction Fab, le cétuximab se lie spécifiquement au récepteur avec une affinité de 5 à 10 fois supérieure à celle des ligands endogènes bloquant ainsi leur fixation au récepteur. Le récepteur bloqué, ne peut plus exprimer son activité tyrosine kinase et de ce fait la cascade de transduction du signal est inhibée. La signalisation cellulaire, la différenciation, l'angiogénèse et donc la diffusion des métastases sont interrompus. En plus du blocage du domaine de liaison, le cetuximab induit l'internalisation de l'EGFR. La disponibilité du récepteur est alors diminuée. Enfin en se fixant sur l'EGFR, sa région Fc recrute des cellules de l'immunité et déclenche l'ADCC et la lyse ou phagocytose de la cellule tumorale.

5. Utilisation

Le cétuximab est indiqué dans le traitement du cancer colorectal métastatique avec un gène KRAS non muté, de type sauvage. Il s'utilise en association avec une chimiothérapie.

L'étude Bond (Cunningham, 2004) a montré une efficacité plus importante de l'association cétuximab + irinotécan par rapport au cétuximab seul (22,5% contre 10,8%). La survie sans progression est supérieure (figure 23).

A



B

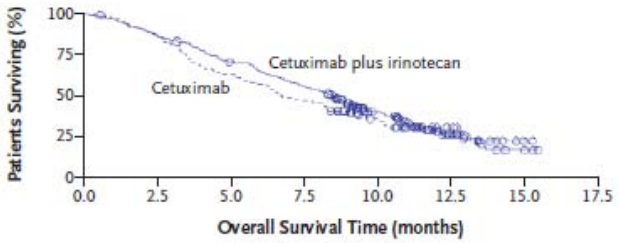


Figure 23: Représentation de la survie sans progression(A) et de la survie globale (B) de l'étude BOND (Cunningham, 2004).

L'étude CRYSTAL a également montré le gain de réponse lors de l'association de cet anti-EGFR avec un protocole FOLFIRI par rapport à un protocole FOLFIRI seul (figure 24).

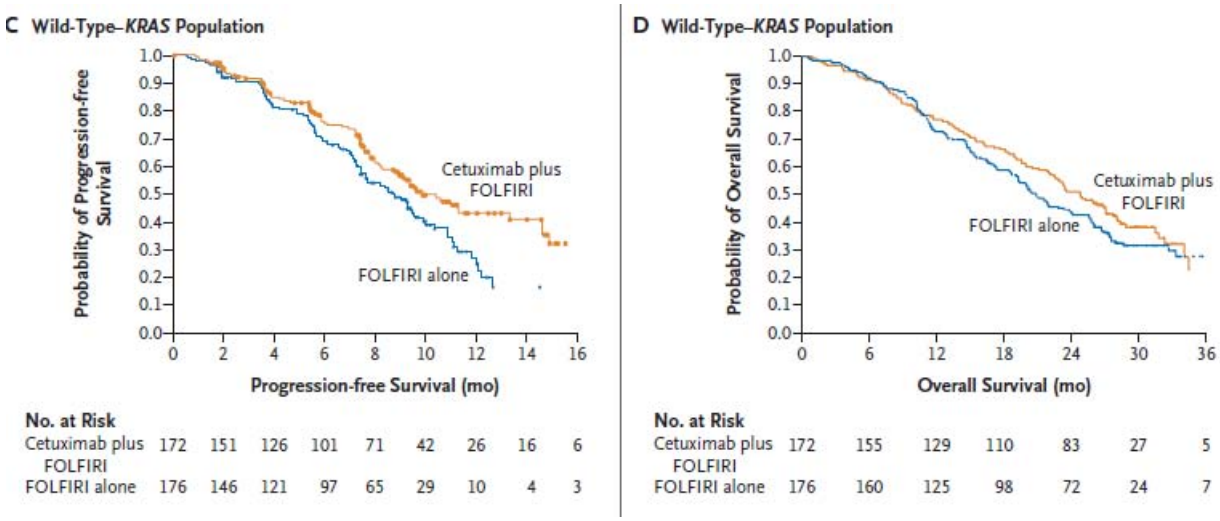

C Wild-Type–KRAS Population
Probability of Progression-free Survival
Cetuximab plus FOLFIRI
FOLFIRI alone
Progression-free Survival (mo)
No. at Risk
Cetuximab plus FOLFIRI 172 151 126 101 71 42 26 16 6
FOLFIRI alone 176 146 121 97 65 29 10 4 3
D Wild-Type–KRAS Population
Probability of Overall Survival
Cetuximab plus FOLFIRI
FOLFIRI alone
Overall Survival (mo)
No. at Risk
Cetuximab plus FOLFIRI 172 155 129 110 83 27 5
FOLFIRI alone 176 160 125 98 72 24 7

Figure 24 : Impact du traitement (cétuximab+ FOLFIRI vs FOLFIRI seul) sur des tumeurs non mutées KRAS (étude CRYSTAL) et représentation de la survie sans progression (C) et de la survie globale (D) (Van Cutsem , 2009).

Enfin, l'étude OPUS montre le gain d'efficacité de l'association cétuximab/FOLFOX 4 par rapport au FOLFOX 4 seul (Bokemeyer, 2009) (figure 25).

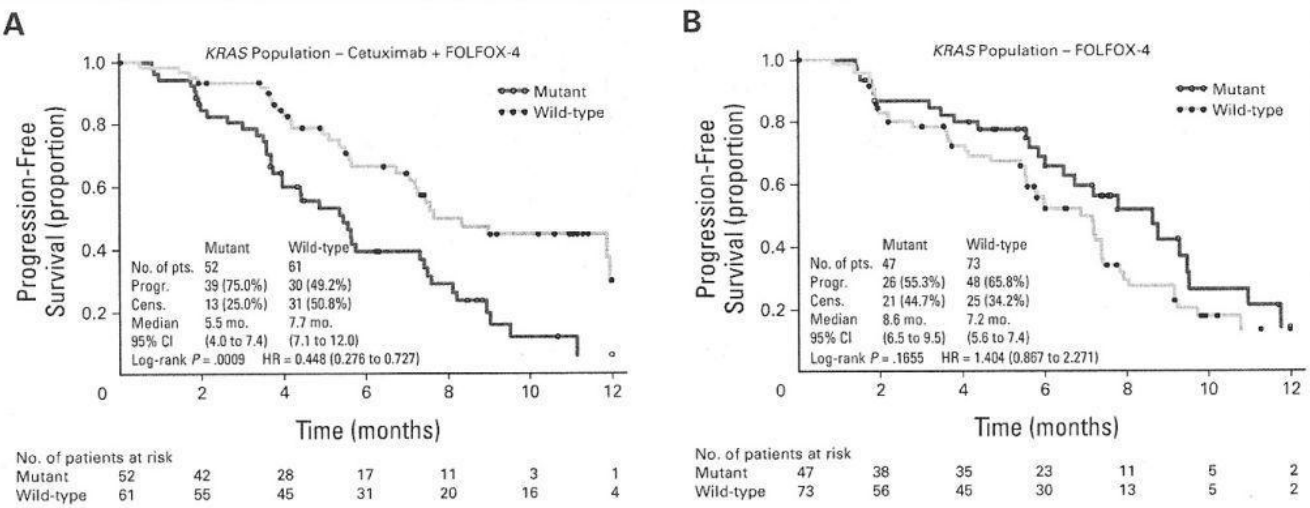


Figure 25 : Représentation de la survie sans progression en fonction du traitement (cétuximab+ FOLFOX 4 (A) versus FOLFOX 4 (B)) et en fonction de la mutation KRAS (étude OPUS) (Bokemeyer, 2009).

Il peut s'utiliser en monothérapie après échec d'un traitement à base d'oxaliplatine et d'irinotécan.

6. Posologie

Généralement une dose initiale de 400mg/m2 est administrée. Puis les doses hebdomadaires sont à de 250mg/m2.

7. Effets indésirables

Les effets indésirables découlent de la nature du produit et de son mécanisme d'action.

L'Erbitux® peut provoquer :

- Affection oculaire (conjonctivite)
- Affection cutanée et sous cutanée (prurit, rash acnéiforme, sécheresse cutanée, desquamation) Ces affections disparaissent à l'arrêt du traitement.

- Affection respiratoire

IV. PANITUMUMAB (VECTIBIX®)

1. Présentation

Vectibix® ou panitumumab est présenté sous forme d'une solution stérile pour perfusion à la concentration de 20mg/ml. C'est un Ac monoclonal (cahier scientifique AMGEN).

2. Structure

Le panitumumab est un anticorps monoclonal de la sous classe de l'immunoglobuline G humaine, produit à partir d'une lignée de mammifère (CHO).C'est un anticorps entièrement humain.

3. Mode d'administration

L'administration se fait par perfusion intraveineuse à l'aide d'une pompe à perfusion.

4. Pharmacodynamie

Le panitumumab se lie avec une grande affinité à EGFR humain inhibant ainsi l'autophosphorylation du récepteur.

La fixation à EGFR entraîne

- L'internalisation de récepteur
- L'inhibition du développement cellulaire
- L'induction de l'apoptose
- Diminution d'IL-8 et du facteur de croissance endothélial vasculaire.

5. Utilisation

Vectibix® est indiqué en monothérapie pour le traitement des patients avec un cancer colorectal métastatique exprimant EGFR et un KRAS non muté, après échec des protocoles de chimiothérapie à base de fluoropyrimidine (5-FU), oxaliplatine et irinotécan.

Une étude internationale incluant 463 patients atteint de cancer colorectal métastatique après échec des protocoles contenant de l'oxaliplatine et de l'irinotécan, a montré que le taux de progression de la maladie chez les patients traités par panitumumab en association avec les soins palliatifs a été réduit de 40% par rapport à des patients en soins palliatifs seul. Le taux de survie est également augmenté (Amado, 2008) (figure 26).

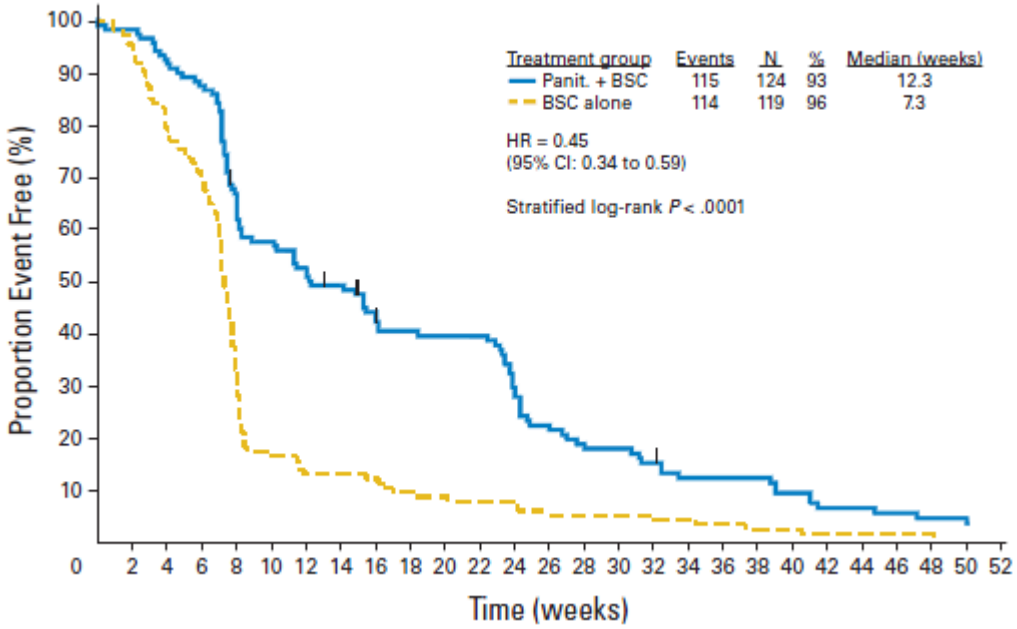


Figure 26 : Effet du panitumumab sur la survie sans progression par rapport à un traitement palliatif (Amodo, 2008)

6. Posologie

Vectibix® est à diluer dans une solution de chlorure de sodium (Nacl) à 0.9%.La dose se détermine en fonction du poids corporel du patient soit 6mg/kg. La concentration finale ne devant pas dépasser 10 mg/ml.

7. Effets indésirables

Il peut se produire :

- Une réaction dermatologique d'intensité légère à modérée (alopécie, rash)
- Affections respiratoires (toux, dyspnée)
- Affection oculaire (conjonctivite, croissance des cils, larmoiement, sécheresse, prurit)
- Diarrhée

- Fatigue
- Trouble du métabolisme et de la nutrition (hypomagnésie, déshydratation)
- Céphalée

PARTIE III :

Les facteurs prédictifs de réponses aux traitements anti-EGFR.

I. QU'EST-CE QU'UN BIOMARQUEUR?

1. Définition

D'après la définition de la NIH, un biomarqueur est une caractéristique qui est objectivement mesurée (c'est-à-dire avec une précision et une reproductibilité suffisante) et évaluée comme un indicateur du processus biologique, du processus pathogénétique ou de la réponse pharmacologique lors d'une thérapeutique. C'est un paramètre caractérisant un état physique, un état pathologique, l'évolution d'une maladie ou la réponse à un traitement. Le biomarqueur tumoral est donc une caractéristique de la tumeur (PIPAM, 2009).

Les biomarqueurs prédictifs en cancérologie, sont utilisés pour permettent entre autre la sélection des patients avec un profil moléculaire particulier apte à répondre à une certaine thérapeutique.
Le fait que le biomarqueur s'exprime est une condition nécessaire mais pas suffisante pour que le traitement fonctionne ou pas.

Le biomarqueur idéal doit être:

- Mesuré avec précision et reproductibilité
- Sensible
- Spécifique de la maladie
- Son étude doit être simple
- Accès facile aux tissus le contenant

Parmi les facteurs prédictifs de réponse au traitement utilisés dans le cas du cancer colorectal, la mutation du gène KRAS est la plus étudiée.
D'autres facteurs existent comme :

- Le nombre de copies du gène EGFR
- PI3KCA /PTEN, BRAF
- Amphiréguline et epiréguline
- Polymorphisme du récepteur Fc gamma propre à chaque patient

2. Les marqueurs biologiques

a. Marqueur biologique de la cible : EGFR

- **Expression de l'EGFR**

L'expression d'EGFR est parfaitement contrôlée au niveau des cellules normales. Ce n'est plus le cas au niveau des cellules tumorales où l'on observe une surexpression du récepteur, sa dimérisation ainsi qu'une activation de la tyrosine kinase.
Cette surexpression est présente dans 60% à 80% des cancers colorectaux.
Elle est associée à un pronostic négatif.
Plusieurs stratégies visent à bloquer ce récepteur :

- Anticorps monoclonaux
- Inhibiteur de l'activité tyrosine kinase
- Vaccin anti-EGFR
- Oligonucléotides antisens

Diverses techniques ont été employées afin de mettre en évidence l'expression de l'EGFR ainsi que pour quantifier son niveau de surexpression.
L'immunohistochimie est la méthode la plus utilisée. Elle permet de mettre en évidence la protéine EGFR à la surface des cellules à partir de coupes tissulaires (Spano, 2007). Cette technique consiste en un marquage de l'EGFR au moyen d'un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire. Le marquage obtenu est membranaire (Meert, 2003). Cette technique pose le problème de la reproductibilité et de la détermination des valeurs seuils. Toutefois, un score immunohistochimique quantitatif permet l'évaluation de l'expression de l'EGFR dans les tumeurs colorectales (O+ aucune expression à 3+ expression forte). Enfin, il faut faire attention aux faux négatifs. En effet, les cellules tumorales les plus superficielles peuvent être négatives alors que celles en profondeur de la tumeur surexprime le récepteur.
Une autre méthode utilisée est l'hybridation in situ. Elle recherche l'amplification du gène de l'EGFR. La grande majorité des études ont montré une corrélation entre le nombre de copies de l'EGFR déterminées par hybridation in situ et la réponse (Khambata-Ford,2007).
La PCR quantitative sert également à l'analyse.

Valeur prédictive de l'EGFR :
Pour qu'un patient puisse recevoir un traitement par cétuximab, il fallait que le marquage immunohistochimique affecte 1% des cellules tumorales. Cette notion est devenue obsolète car il a été démontré que des tumeurs colorectales ne surexprimant pas l'EGFR pouvaient répondre à un traitement par anticorps anti-EGFR. (Chung, 2005).
Par contre le nombre de copie d'EGFR est un facteur pronostique des cancers du poumon non à petites cellules (Hirsch, 2003). En effet, il y a une corrélation entre le nombre de copie d'EGFR et la réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase.

- **Polymorphisme des récepteurs Fc gamma**

Le cétuximab et le panitumumab sont deux AC se fixant sur l'EGFR par leur partie Fab. Le fragment Fc étant libre pour recruter les cellules notamment de l'ADCC. Le fragment Fc de l'Ac interagit avec le récepteur à ce fragment au niveau de la cellule immunitaire. Ce récepteur est de type Fc gamma et un polymorphisme (variation entre les individus de la séquence des gènes) existe : Fc gamma RIIa et Fc gamma RIIIa.

Bibeau et son équipe (Bibeau, 2009) ont montré que la réponse au traitement par cétuximab était meilleure si le récepteur est de type Fc gamma RIIIa 131 H/H ou Fc gamma RIIa 158 v/v. Le polymorphisme joue un rôle pronostic dans le CCRm traité par cétuximab. La survie sans progression de la maladie est supérieure.

Zhang et al, ont mené une étude en 2007 sur 39 patients traités uniquement par cétuximab. Ils ont observé que selon le polymorphisme de ce récepteur, la survie sans progression était différente.

Très récemment, il a été démontré que les Ig G de type II comme le panitumumab, ne déclenche l'ADCC qu'au niveau de la lignée myéloïde (Schneider-Merck, 2010).

b. Les ligands de l'EGFR

L'épiréguline ou EREG fixe ErbB et ErbB4 et l'amphiréguline ou AREG fixe ErbB1.

Une étude a été réalisée sur 110 patients avec un cancer colorectal métastatique traités par cétuximab en monothérapie. L'analyse des biopsies a montré que les patients pour lesquels la concentration en epiréguline et amphiréguline est élevée, répondent mieux au cétuximab (Khambata-ford, 2007)

Jacobs (Jacobs, 2009) a également réalisée une étude sur 220 patients traités pour un CCRm par une association de cétuximab et d'irinotécan. Jacobs a observé que les ARNm de EREG et de AREG sont en concentration plus importante au niveau des tumeurs à KRAS non muté. L'équipe a montré qu'il existe une corrélation entre la probabilité de réponse au traitement et la concentration en épiréguline et amphiréguline.

c. Les voies de signalisation de l'EGFR.

- **KRAS**

Description

Les 3 gènes Ras (H-ras, N-ras et K-ras) appartiennent à la superfamille des protéines de liaison au GTP.
Le gène KRAS est situé sur le bras court du chromosome 12 (12p11.22). C'est un oncogène isolé à partir du Kristen rat sarcoma Virus. Il code pour une protéine de 21 KDa, la protéine Ras. Cette protéine intervient dans la cascade des signaux intracellulaires allant de la surface de la cellule au noyau lors de la fixation de EGF à son récepteur, EGFR.

Action normale

La protéine Ras appartient à la voie des MAP Kinase (RAS/RAF/ MEK /ERK). Elle régule l'expression des gènes lors de la différenciation cellulaire et lors de la croissance cellulaire.
La protéine Ras est liée au GTP quand elle est activée et au GDP quand elle est inactive.
La fixation du ligand sur son récepteur entraine l'activation de la protéine Ras en Ras-GTP. Ce complexe est rapidement inactivé en Ras-GDP.

L'activité de la protéine est étroitement régulée par le GEPs (Guanine Exchange Protein) et la GAPs (GTP-ase activation protein)
GAPs exerce une régulation négative sur Ras tandis que GEPs régule positivement Ras.

Action anormale

La mutation du gène KRAS est impliquée dans 30% des cancers. Elle est retrouvée au niveau du cancer colorectal dans 50% des cas, dans les cancers du poumon (25 à 50 %), du pancréas et de la thyroïde. La mutation intervient sur les codons 12 et 13 essentiellement pour le cancer colorectal. Il s'agit d'une mutation affectant un nucléotide. Trois mutations sont majoritairement recherchées car leur incidence est d'environ 75% (G35A, G35T, G38A) (figure 27). Elles transforment la glycine en valine ou en acide aspartique.
La protéine ainsi mutée devient résistante à la régulation négative du GAPs.
Elle est donc perpétuellement active et la transduction du signal est faite en permanence indépendamment de la fixation du ligand sur son récepteur.
La cellule acquiert une capacité importante de prolifération.

Fréquence des mutations *KRAS* chez les patients atteints de CCR (4)
Données extraites de l'étude RASCAL II et du catalogue des mutations somatiques oncogènes (COSMIC, Institut Sanger)

Mutation *KRAS*	Acide aminé substitué	Nucléotide substitué	Incidence
Codon 12	Aspartate (G12D)	G35A	**32,5 %**
	Valine (G12V)	G35T	**22,5 %**
	Cystéine (G12C)	G34T	8,8 %
	Sérine (G12s)	G34A	7,6 %
	Alanine (G12A)	G35C	6,4 %
	Arginine (G12r)	G34C	0,9 %
Codon 13	Aspartate (G13D)	G38A	**19,5 %**
Autres codons			1,8 %

Figure 27 : Localisation des mutations KRAS

KRAS et traitement

Une étude (Lièvre, 2008) a recherché chez 89 patients traités pour un cancer colorectal métastasique, la mutation KRAS. Ces patients étaient traités par cétuximab. 26 des 89 patients ont répondu au cétuximab et n'étaient pas porteur de la mutation. La mutation KRAS a été retrouvée au niveau de la tumeur de 24 patients et le traitement n'avait pas fonctionné. La mutation KRAS entraine donc la résistance au cétuximab.
Lièvre A et son équipe (Lièvre, 2008), ont observé que les patients sans mutation KRAS vivent d'une manière générale plus longtemps que les patients avec une tumeur portant la mutation KRAS. La survie sans progression et la survie globale sont plus élevée (31,4 semaines vs 10,1 semaines et 14,3 mois vs 10,1 mois respectivement) (figure 28).

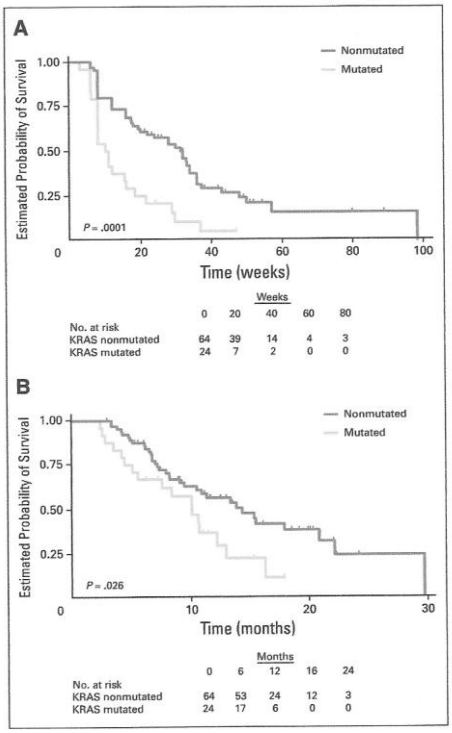


Figure 28: Représentation de la survie sans progression (A) et de la survie globale (B) en fonction de la présence ou l'absence de mutation KRAS (Lièvre, 2008).

Benvenuti et al, ont également conclu à une réponse négative du cétuximab ou panitumumab en présence de mutations KRAS (Benvenuti, 2007).

<u>En l'absence de mutation KRAS (KRAS sauvage) (figure 29)</u>

Le ligand se lie sur la partie extracellulaire. Il s'ensuit la phosphorylation du domaine tyrosine kinase en intracellulaire et l'activation de la cascade de transduction du

signal. Si la fixation du ligand est empêchée par le cétuximab ou le panitumumab, la phosphorylation ne se fait pas.

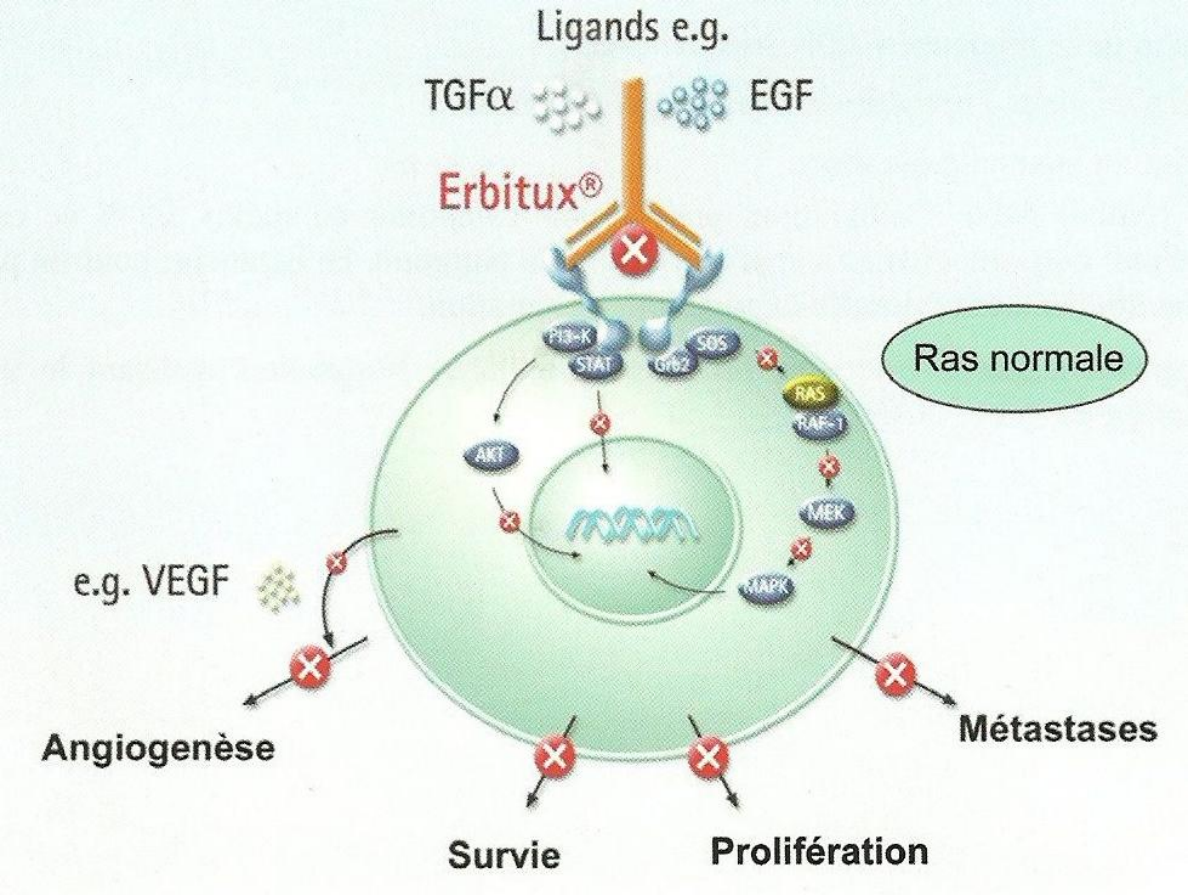


Figure 29: Mode d'action du cétuximb (Erbitux) quand le gène KRAS est de type sauvage.

<u>En présence de mutations KRAS (figure 30)</u>

Les anticorps anti-EGFR se lient très spécifiquement à l'EGFR pour le bloquer. Lorsque la protéine RAS est mutée, elle est constamment activée indépendamment de la fixation du ligand. La fixation des anticorps n'a aucun effet sur la signalisation.

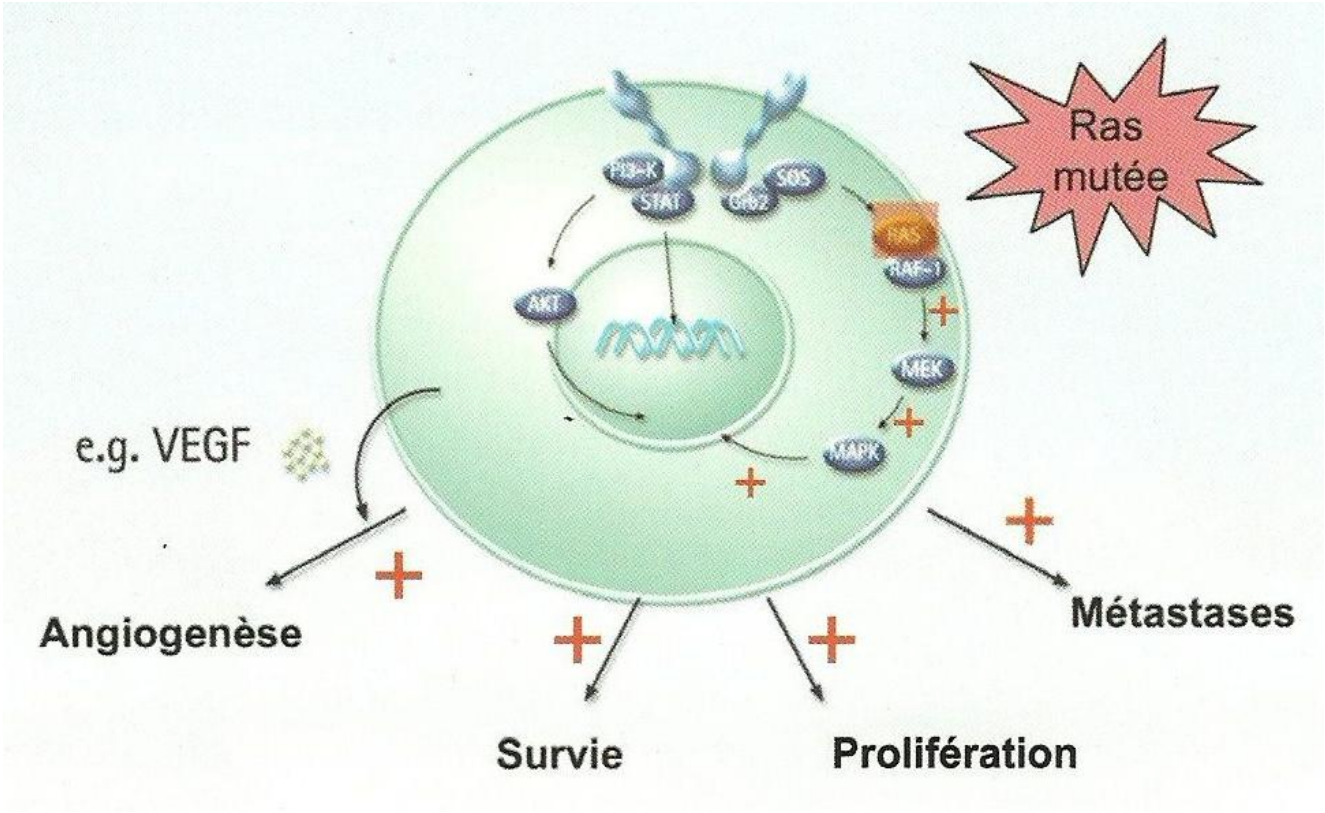


Figure 30: Perturbation entrainée par un KRAS muté.

- **BRAF**

La protéine BRAF est une sérine thréonine kinase. C'est l'effecteur principal de KRAS. Di Nicolantonio et al (Di Nicolantonio, 2008) ont réalisé une étude basée sur l'hypothèse que si KRAS est sauvage, la mutation de BRAF est un facteur prédictif de réponse au traitement monoclonal.
Sur 113 patients, 34 ont une tumeur portant la mutation KRAS et 79 ont le type sauvage.
Sur les 79 patients à KRAS sauvage, 11 présentent une mutation de BRAF au niveau de l'allèle V600E. Ces 11 patients ne répondaient pas au traitement par anticorps anti-EGFR.
Par contre après administration d'un inhibiteur de BRAF, la sensibilité aux anti-EGFR est retrouvée. La mutation de BRAF est donc un facteur prédictif de réponse au traitement par anti-EGFR. Les mutations de KRAS et de BRAF sont exclusives.

La valeur prédictive de BRAF comme facteur de réponse au traitement, est une notion controversée. D'autres études, comme celles de Laurent-Puig (Laurent-Puig,

2009) n'attribue pas de valeur prédictive à ce marqueurs mais plutôt une très forte valeur pronostic quant à la survie sans progression et à la survie globale.
Il a également été démontré que les patients avec une tumeur BRAF mutée on un risque de progression de la maladie plus important que les patients avec une tumeur BRAF sauvage. La mutation de BRAF est là aussi un facteur pronostic de la maladie (Souglakos, 2009).

Enfin, la mutation de cette protéine est retrouvée chez les patients avec un CCRm où le système de réparation de l'ADN, MMR (DNA mis match repair) est déficient. La déficience est prouvée par l'instabilité microsatellitaire. Le MMR est altéré dans 10 à 15% des CCR par mutation du gène hMLH1 (Samowitz, 2006 et Miyakura, 2001).

La mutation BRAF est plus fréquente quand les tumeurs montrent une instabilité des microsatellites et pour des patients au stade III du CCR.

- **PI3K/PTEN**

Lorsque le ligand se fixe sur le récepteur, la voie Ras/MAPK n'est pas la seule à être activée. La voie PI3K/ PTEN/AKT l'est également.

PI3KCA est un oncogène. Elle permet la transformation du phosphatidyl-inositol 2 biphosphate (PIP2) (inactif) en phosphatidyl-inositol 3 phosphate (PIP3) (actif) qui activera AKT. Une mutation du gène codant cette protéine entrainerait une résistance aux traitements par anti-EGFR. Au contraire de toutes ces études, Prenen et al (Prenen, 2009) et Siena (Siena, 2009) ont démontré que la mutation de PI3KCA seule n'est pas suffisante pour conclure à la résistance aux traitements monoclonaux.

PTEN (phosphatase and tensin homolog) est une protéine suppresseur de tumeur codée par un gène localisé sur le chromosome 10. Elle permet, par sous activité de phosphatase, de passer du PI3P au PI2P. Elle participe à la régulation du cycle cellulaire en empêchant les cellules de se diviser trop rapidement et de façon incontrôlée (inhibition de l'activation AKT permettant l'action de la p53). Le gène de cette protéine peut soit être muté soit on observe une perte d'expression de PTEN dans les tumeurs.
L'absence de la protéine PTEN est observée dans 30% des cancers colorectaux (Thomas, 2004).

Pour démontrer le rôle prédictif de réponse aux traitements monoclonaux, Frattini et son équipe (Frattini, 2007) ont montré que l'absence de cette protéine peut être considérée comme un facteur prédictif de résistance aux traitements par cétuximab. Frattini a réalisé une étude sur 27 patients atteints de CCRm. 11 patients présentent une perte de la protéine PTEN et aucune réponse au traitement par anticorps anti-EGFR. La protéine PTEN à été dosées sur les 16 autres patients. 10 d'entre eux sont répondeurs au traitement. Les 6 autres sont non répondeurs au traitement par anti-EGFR. 4/6 présentent une mutation KRAS (tableau 5).

De même que pour BRAF, la valeur prédictive de réponse au traitement est controversée (laurent-Puig, 2009). Laurent-Puig, montre seulement un effet sur la suivie globale de PTEN et lui attribue plutôt une valeur pronostic.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif de la réponse de 27 patients au traitement par anti-EGFR (Frattini, 2007)

	Patient sans PTEN	Patient avec PTEN
	11	16
Réponse au traitement	0	10
Pas de réponse au traitement	11	6

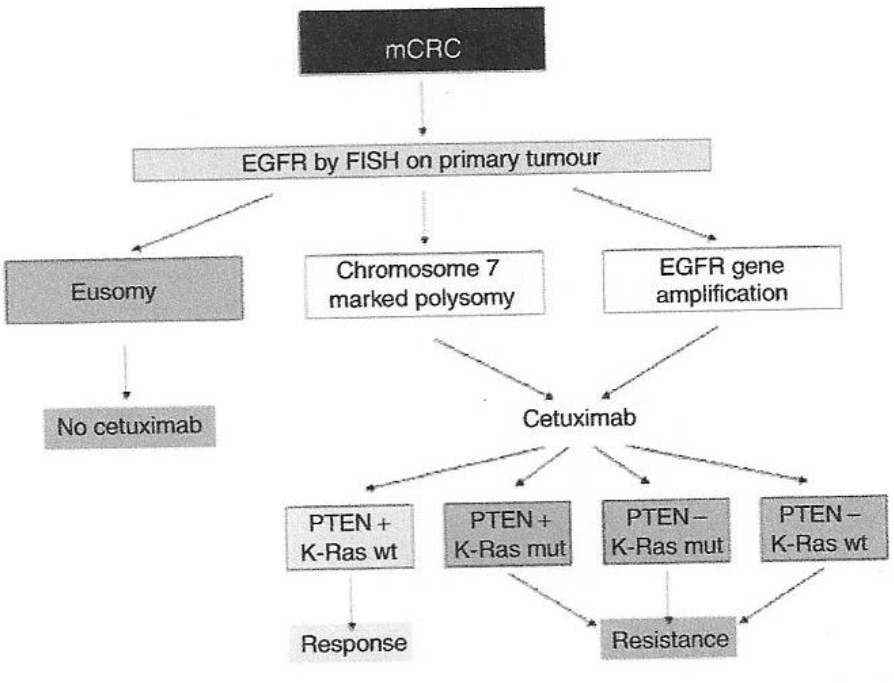


Figure 31 : Algorithme de réponse au cétuximab en fonction du statut de KRAS, PTEN et de l'EGFR (Frattini, 2007).

Le Centre Alexis Vautrin de Nancy a étudié, en collaboration avec l'hôpital européen, les phosphoprotéines des 2 voies principales de signalisation intracellulaire (pMEK, pERK1/2, pAKT, pP70S6K, et pGSK3beta) sur les tumeurs de 42 patients traités par anti-EGFR (panitumumab ou cétuximab).Après dosage, et recherche des mutations, il a été observé que la résistance au traitement est liée au niveau d'expression de pP70S6k. Le haut niveau d'expression de cette phosphoprotéine est associé, indépendamment du statut KRAS, à une survie globale diminuée (Perkins, 2010).

d. Toxicité cutané

Les anticorps anti-EGFR ont de nombreux effets indésirables. Les réactions cutanées et sous-cutanées (éruptions, rash acnéiformes, sécheresse cutanée, prurit, desquamation, atteinte unguéal) (Perz-Soler, 2003 et Segaert, 2005). Ces effets touchent approximativement les 3/4 des patients sous Erbitux® mais ils restent peu sévères dans 85% des cas.

Ces réactions apparaissent habituellement au cours de 2 ou 3 premières semaines de traitement. Ces réactions semblent être dépendantes de la dose et être corrélée à l'efficacité du traitement dans le CCR et le carcinome épidermoïde de la tête et du cou (Van Cutsem, 2004).
La sévérité du la réaction cutanée est classée en grade (tableau 6).

Tableau 6 : Les effets secondaires cutanés des traitements par anti-EGFR.

Effet secondaire	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
Atteinte des ongles	Koilonychie, changements de coloration, déformations	Perte partielle ou complète de l'ongle, douleur du lit de l'ongle	Interfère avec les AVJ	-	-
Photosensibilité	Erythème non douloureux	Erythème douloureux	Interfère avec les AVJ	-	-
Prurit	Léger ou localisé	Intense ou étendu	Intense ou étendu, interfère avec les AVJ	Dermatite généralisée, exfoliative, ulcérative ou bulleuse	Décès
Rash/ desquamation	Maculaire ou papulaire ou érythème sans symptômes associés	Eruption maculaire ou papulaire, érythème prurigineux ou associé à d'autres symptômes. Desquamation localisée ou autres lésions couvrant moins de 50 % de la surface corporelle	Erythrodermie généralisée ou éruption maculaire, papulaire ou pustuleuse. Desquamation couvrant plus de 50 % de la surface corporelle. *Rash* accompagné de douleur, défiguration, ulcérations ou desquamation	-	Décès

Le rash serait dû à l'inhibition de HER1 au niveau de la peau (Perez-Soler, 2005). En effet, HER1 est exprimé au niveau des kératinocytes des follicules pileux, de l'épiderme, des glandes sébacées et écrines. Au niveau cutané, il a pour rôle de stimuler la prolifération des kératinocytes, assurer leur survie, leur mobilité, réguler leur différenciation et favoriser la guérison des plaies.
Après analyse du rash sur des patients traités par cétuximab, Busam et al (Busam, 2001) ont conclu que le rash est caractérisé par une périfolliculite ou une folliculite sans origine infectieuse. Le mécanisme est encore méconnu mais des hypothèses ont été émises. La réaction serait liée à l'inflammation due au déblocage des chimiokines.

PARTIE IV :

Organisation du génotypage KRAS en Lorraine.

Enquête de satisfaction.

Nous avons vu précédemment que lors d'un cancer du colon métastatique, le patient n'est pas soigné avec les mêmes thérapeutiques selon que la tumeur est porteuse ou non de la mutation KRAS.
Le Centre Alexis Vautrin de Nancy organise le génotypage KRAS en Lorraine dans le cadre de l'activité de la plateforme régionale de génétique moléculaire des tumeurs de l'INCa.

I. PRÉSENTATION DE L'INCA

L'INCa a été crée par la loi de santé publique du 9 août 2004, dans le cadre du plan cancer. Il est placé sous la tutelle des ministères chargés de la recherche et de la santé. L'INCa permet d'instaurer une politique nationale.
Il couvre tous les domaines de la lutte contre le cancer.
Le but de cet institut est de diminuer la mortalité par cancer en France et d'améliorer la qualité de vie des personnes atteintes d'un cancer.
En agissant pour :

- Mieux prévenir les cancers par action sur les facteurs de risques et en développant le dépistage.
- Diagnostiquer le plus tôt possible les cancers.
- Garantir l'accès aux soins de grande qualité pour tous dans le respect du principe d'équité.
- Rendre plus accessible les innovations et les progrès.
- Rechercher les moyens les plus efficaces pour prévenir, diagnostiquer, traiter les cancers.

Pour réaliser leurs objectifs, l'INCa produit des expertises à la demande du ministère, anticipe les problématiques, diffuse les recommandations de bonnes pratiques et réalise des campagnes d'information auprès du grand public.

L'article L3321415-2 du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique, fixe les missions de l'INCa, à savoir :

- L'observation et l'évaluation de la lutte contre le cancer
- La définition des bonnes pratiques et des conditions nécessaires à la qualité de la prise en charge des malades.
- L'information du public et des professionnels

- La réalisation de toutes les expertises sur les questions relatives à la cancérologie.
- La participation à la formation des professionnels
- La mise en œuvre et le financement d'action de recherche et de développement en cancérologie.
- Le développement d'action commune entre opérateurs publics et privés.
- La participation à des actions européennes et internationales.

Tous les ans l'INCa publie un rapport d'activité.

En 2006, l'INCa a labellisé les plateformes de génétique moléculaire et a mis en place un programme de développement des plateformes hospitalières de génétique somatique des cancers. 28 plateformes labellisées sont réparties sur l'ensemble du territoire (figure 32). C'est un projet national créé pour donner accès aux traitements innovants à l'ensemble des patients d'une région quelque soit l'établissement où il est pris en charge. Les plateformes régionales doivent être capable de répondre à la demande de génotypage KRAS avec une sécurité maximale et dans un délai compatible avec l'instauration du traitement (Blons, 2009). Un rapport d'activité est rendu chaque année à l'INCa qui en fera une synthèse nationale (INCa, 2009).
Il n'existe pas à ce jour, de techniques de référence, de norme qualité ou de contrôle externe de qualité. Chaque plateforme s'est donc organisée selon ses moyens. La mise en place de recommandations générales, de contrôle qualité sont des objectifs du projet national STIC MOKAECM coordonnées par le professeur Pierre Laurent-Puig (HEGP, paris).

Figure 32 : Plateformes de génétique moléculaire des cancers (INCa, 2009).

II. DE LA BIOPSIE A L'ANALYSE

Pour réaliser cette partie, j'ai effectué un stage au sein de la plateforme.

L'obtention d'un résultat fiable dans un délai compatible avec l'instauration du traitement repose sur la collaboration entre le clinicien, le pathologiste et le laboratoire de génotypage KRAS (figure 33).

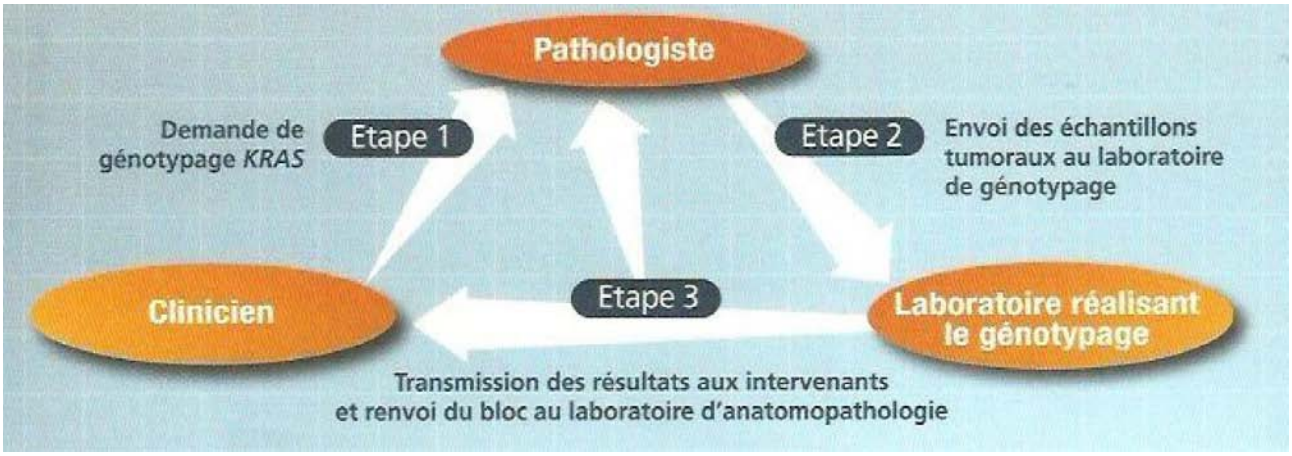

Pathologiste
Demande de génotypage *KRAS*
Etape 1
Etape 2
Envoi des échantillons tumoraux au laboratoire de génotypage
Clinicien
Etape 3
Laboratoire réalisant le génotypage
Transmission des résultats aux intervenants et renvoi du bloc au laboratoire d'anatomopathologie

Figure 33 : Interaction entre le prescripteur, le pathologiste et le laboratoire.

La tumeur a été préalablement fixée au formol.
Le pathologiste reçoit les demandes de génotypage KRAS des cliniciens (annexe 2). Il désarchive les prélèvements tumoraux du patient c'est-à-dire qu'il récupère les anciens prélèvements) et sélectionne les blocs représentatifs de la tumeur. Enfin, il expédie le bloc avec le compte rendu, à la plateforme de génotypage.
Les techniciens du CAV reçoivent un bloc de paraffine contenant le tissu à analyser provenant soit de la tumeur primitive, soit des métastases (Bibeau, 2009). Ce bloc est découpé au microtome en ruban de 5 micron d'épaisseur (figure 34).

Figure 34:Microtome et ruban de paraffine

Une partie du ruban est déposée sur une lame puis un fixateur est appliqué. Enfin la lame est colorée à l'hématoxyline-éosine-safran (figure 35).

Figure 35: La lame et le bloc

La lame est ensuite transmise au médecin anatomopathologiste de la plateforme pour qu'il identifie une zone contenant plus de 50% de cellules tumorales. La zone d'intérêt est cerclée avec un marqueur (figure 36).

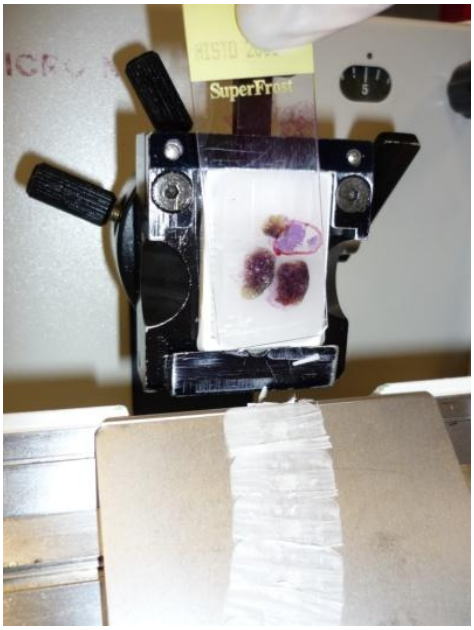


Figure 36: Correspondance entre la zone cerclée par l'anatomopathologiste et le bloc

S'il y a plus de 50% de cellules tumorales, le test est considéré comme fiable (Bibeau, 2009) Sinon les cellules saines peuvent interférer et il y a un risque de conclure à un résultat faux négatif.
Après cerclage, les techniciens vont prélever la zone la plus tumorale du bloc par rapport aux résultats de l'anatomopathologiste. C'est la macro dissection.
Le technicien fera 6 rubans de 10 microns et placera les échantillons tumoraux dans un tube Eppendorf où l'ADN sera extrait (kit QIAGEN QIAamp DNA FFPE tissue) (figure 37).

Figure 37: Kit QIAGEN

III. L'ANALYSE

Le CAV recherche la mutation du gène KRAS muté à partir de 3 techniques :

- PCR RFLP
- PCR HRM
- TAQMAN

1. PCR RFLP

a. Principe

La PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier les segments d'ADN d'intérêt délimités par des amorces. A chaque cycle l'ADN est dupliqué.
L'amplification se fait par une suite de réplication de la matrice ADN à double brin.
Les amorces choisies sont spécifiques de la zone d'intérêt.

La première étape est la dénaturation de l'ADN double brin par une température de 95°C.
A cette température les liaisons faibles qui relient les 2 brins d'ADN se rompent.
Intervient ensuite l'hybridation des amorces sur chacune des 2 chaînes par appariement complémentaire des bases.
Et enfin l'élongation à partir des amorces permet de former 2 copies d'ADN.
L'élongation se fait par ajout de dNTP sous l'action de l'ADN polymérase à une température de 72°C (figure 38).

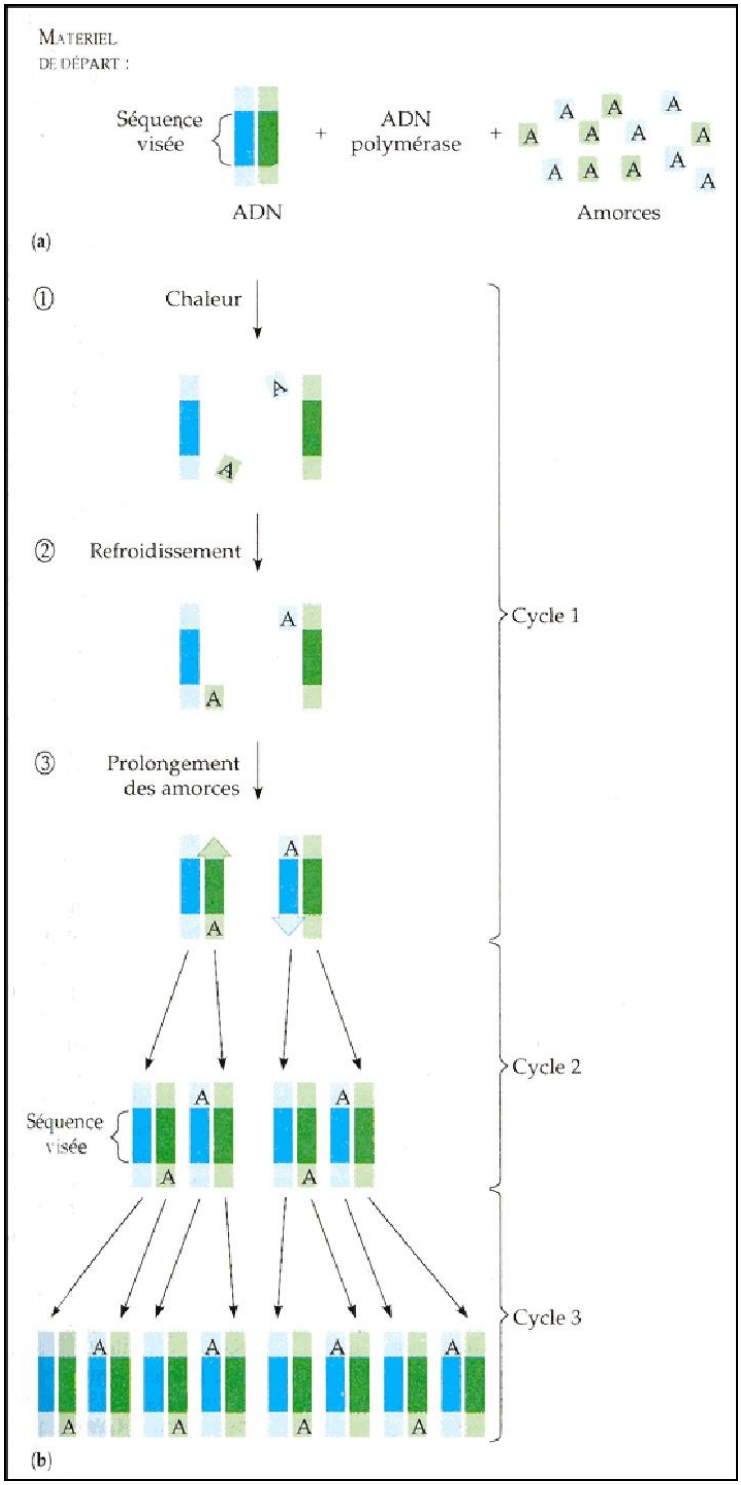


Figure 38: Principe de la PCR

La PCR-RFLP utilise des enzymes de restriction appelées endonucléases de restriction. Ce sont des enzymes qui coupent l'ADN en des sites spécifiques nommés site de restriction. Ces sites correspondent à une courte séquence spécifique selon l'enzyme utilisée. La digestion est réalisée après une première PCR. L'ADN issu de la PCR est incubé en présence de ces enzymes spécifiques des zones à étudier.

Une fois la digestion réalisée et les fragments d'ADN obtenus, il faut les séparer par électrophorèse. L'ADN est dépose à la cathode (-) et va migrer sous l'influence d'un champ électrique vers l'anode (+). La migration est d'autant plus importante que le fragment d'ADN est petit. Les fragments d'ADN sont ensuite révélés et analysés.

b. Analyse

Le travail se fait sous la hotte à mix où l'on va préparer les tubes patients et 4 tubes témoins. Le travail s'effectue sous la hotte pour ne pas contaminer l'ADN.

La première PCR commence par la préparation du MIX composé de :

- Tampon PCR *10
- MgCl2
- dNTP
- Solution Q
- Amorce sens
- Amorce anti sens
- Hot Star Taq PCR
- Eau

Dans chaque tube on donne 23 microlitres de mix + 2 microlitres d'ADN à tester ou témoin.
Les tubes sont placés en thermocycleur Eppendorf pour 3 heures.
Les tubes témoins sont composés d'ADN extrait de lignées cellulaires de cancers coliques humains.

- 1 avec le codon 13 muté. Ce sont les cellules lovo
- 1 avec le codon 12 muté. Ce sont les cellules SW620
- 1 avec ni le codon 12 ni le codon 13 mutés. Ce sont les cellules WiDr wt
- 1 ne contient que de l'eau

A l'issu des 3 heures il y a ajout des enzymes de restrictions Bst XI pour le codon 12 et XcmI pour le codon 13. Ces enzymes vont couper l'ADN amplifié en des sites spécifiques. C'est la première digestion.
La deuxième PCR est lancée pour une durée de 16 heures. Les morceaux d'ADN vont être amplifiés et une seconde digestion sera effectuée.

A la fin de cette PCR on obtient un ADN muté composé de 2 segments ou un ADN non muté composé de 3 morceaux.
L'ADN des patients et les témoins sont placé sur un gel d'agarose pour une migration. A l'issue de cette migration, on verra si des mutations sont présentes ou non sur les codons 12 et 13.

c. Exemple de résultat

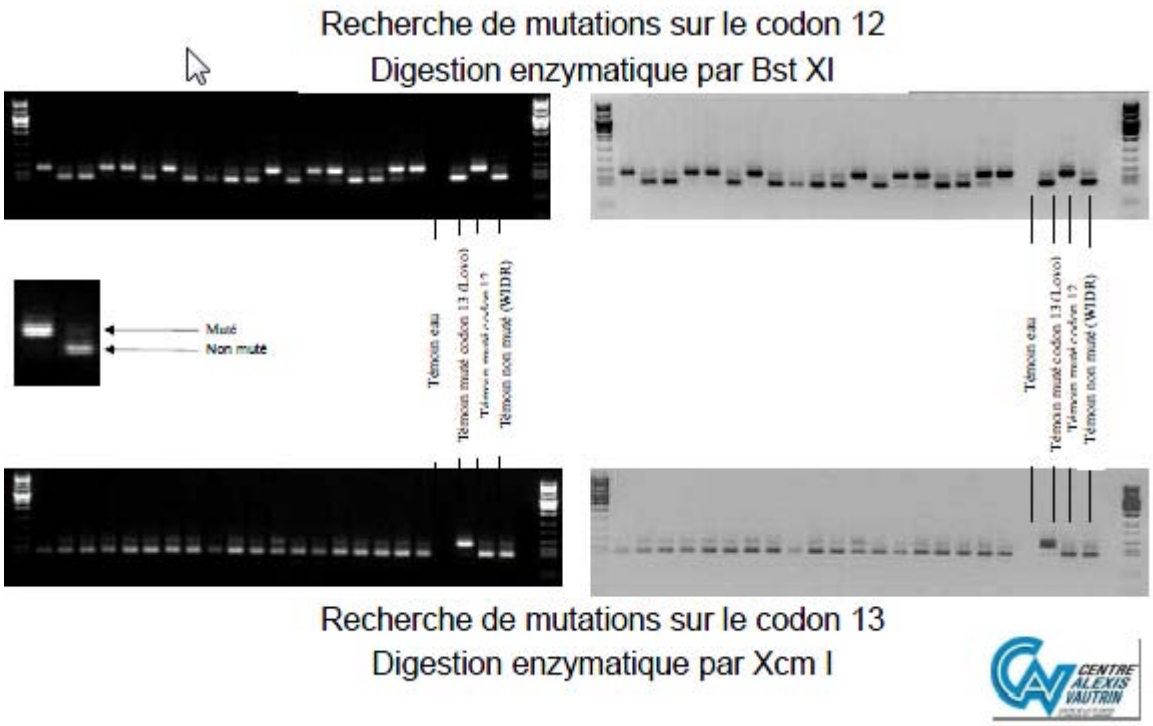

Recherche de mutations sur le codon 12
Digestion enzymatique par Bst XI
Muté
Non muté
Témoin eau
Témoin muté codon 13 (Lovo)
Témoin muté codon 12
Témoin non muté (WIDR)
Recherche de mutations sur le codon 13
Digestion enzymatique par Xcm I
CENTRE ALEXIS VAUTRIN

Figure 39 : Résultat de PCR-RFLP.

Sur la figure 39, on peut voir qu'aucun patient ne présente une tumeur mutée sur le codon 13 car seul le témoin Lovo à migrer.Par contre sur le codon 12, 9 tumeurs sont mutées.

2. Taqman

a. Principe

La sonde Taqman est spécifique de la séquence à amplifier. Elle est marquée par un fluorophore en 5' (reporter) et en 3' (quencher).

Quand le reporter émet de la fluorescence, celle-ci est atténuée par le quencher à proximité. Si la sonde est dégradée, l'intensité de la fluorescence est augmentée. Cette intensité est proportionnelle au produit de PCR. Au cours de la polymérisation l'activité 5' vers 3' de la Taq polymérase dégrade la sonde et l'intensité de la fluorescence augmente (figure 40).

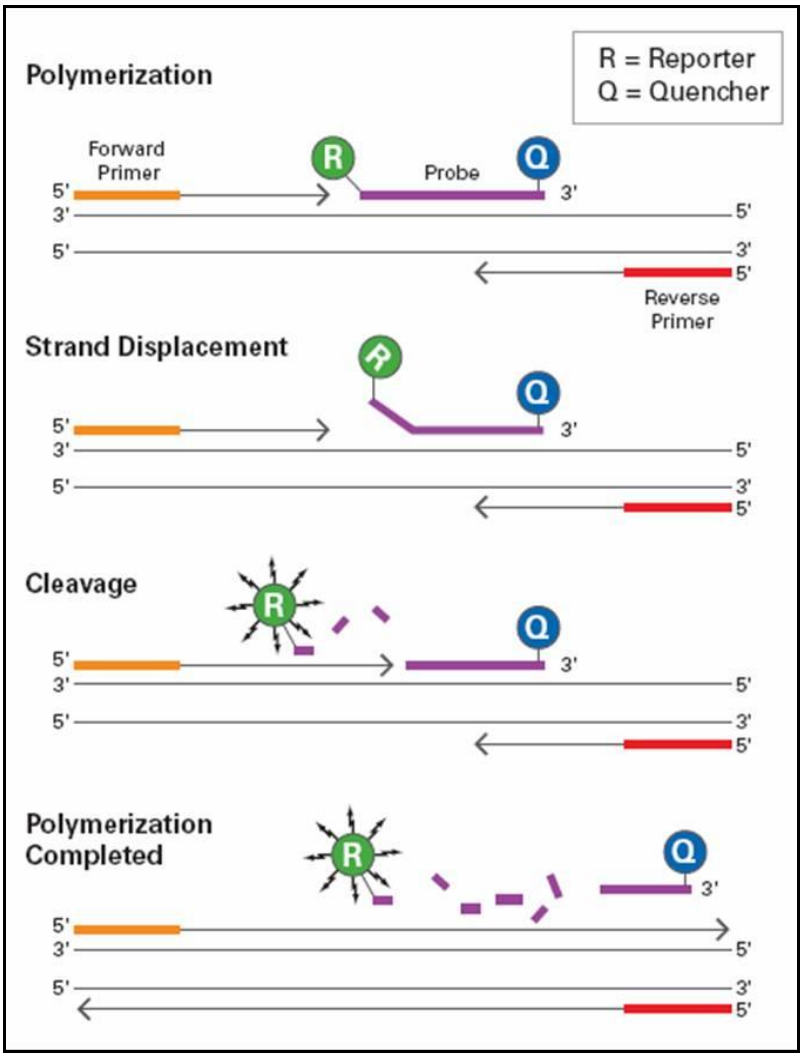


Figure 40: Principe de la sonde Taqman.

b. Analyse

Cette technique donne des résultats rapidement.
Parmi toutes les mutations possibles sur les codons 12 et 13, les 7 mutations les plus fréquemment recherchées sont :

- 6 sur le codon 12
    - 12 1 : GA, GC, GT
    - 12 2 : GA GC, GT
- 1 sur le codon 13
    - 13 2 : GA

Tout d'abord il y a préparation du MIX :

- Genotyping mix
- Assay mix
- Eau

Puis dépôt dans chaque puits de 5 microlitres de Mix et 1 microlitre d'ADN patient ou témoin.
La machine fait 45 cycles.
La sonde VIC permet de voir l'amplification et la sonde FAM la mutation.

c. Exemple de résultat

On peut soit analyser une mutation soit faire l'analyse pour chaque patient et chaque locus

d. Analyse d'un locus pour l'ensemble des patients : exemple 122 GT.

La représentation des profils patients par la sonde VIC montre que l'amplification est correcte, le résultat par la sonde FAM peut donc être analysé (figure 41).

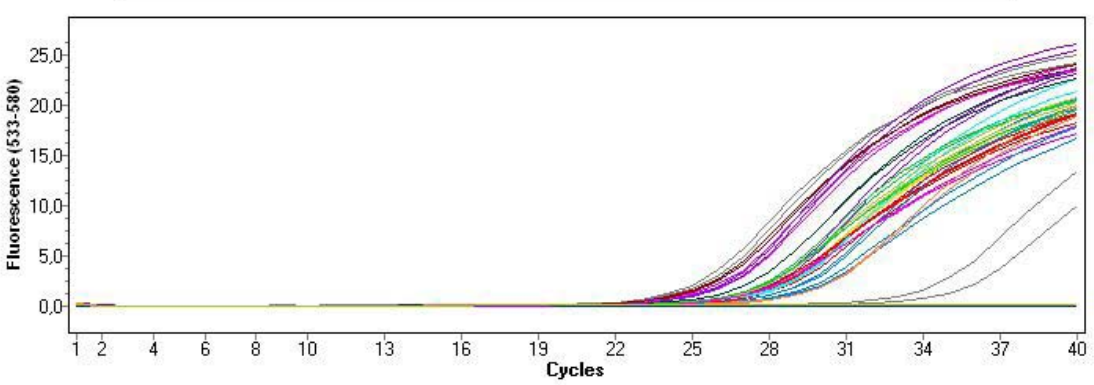


Figure 41 : Représentation à la sonde VIC de l'ensemble des patients pour le locus 122GT.

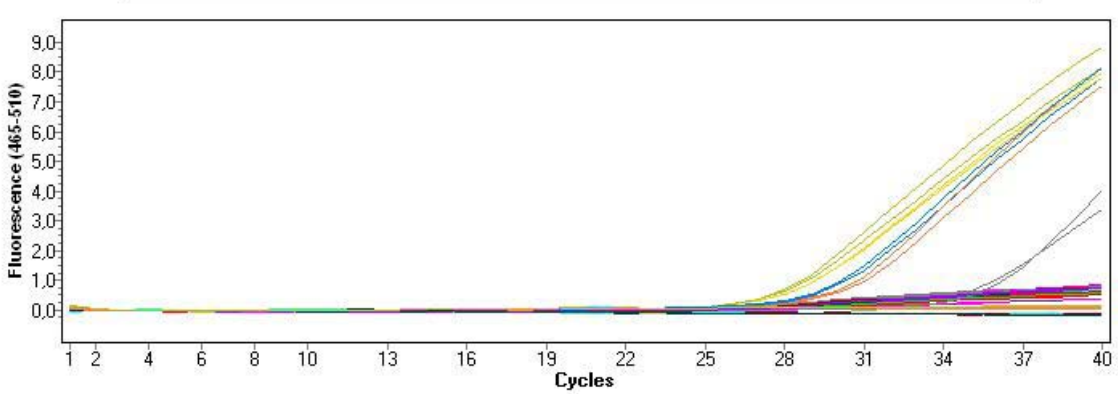


Figure 42 : Représentation à la sonde FAM de l'ensemble des patients pour le locus 122GT.

On constate sur la figure 42 que le profil des courbes des patients se rapproche de celui du témoin non muté.
On peut dire qu'il n'y a pas de tumeurs mutées au codon 12 en 122GT.

e. Analyse d'un locus pour un patient donné: Exemple patient 12 et locus 122 GT.

Par la sonde VIC on voit que l'amplification est correcte et grâce à la sonde FAM on voit que le patient 12 a un profil se rapprochant du témoin muté en 122 GT. Le patient a donc une tumeur mutée pour le gène KRAS (figure 43 et 44).

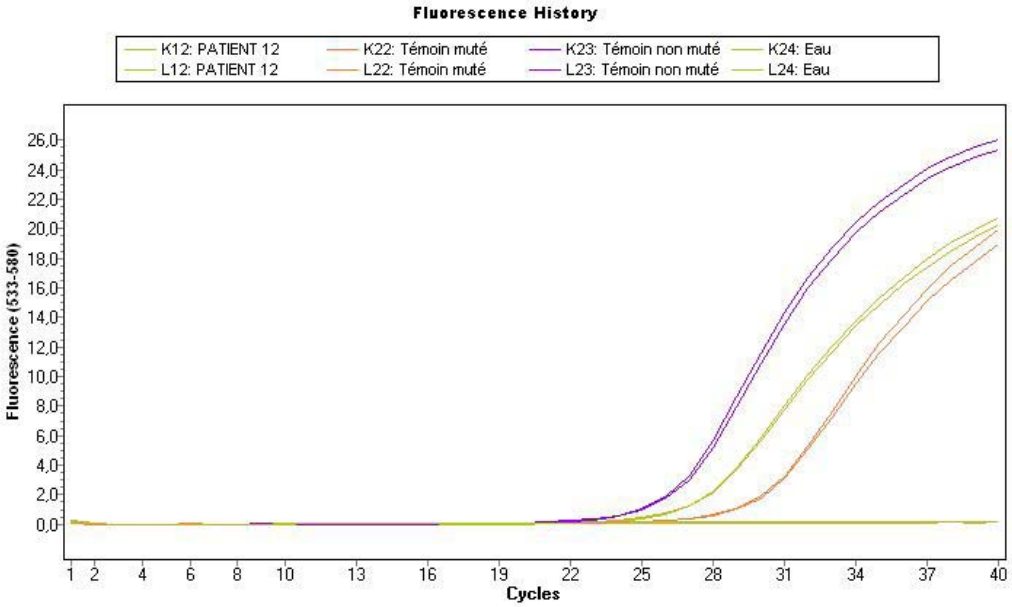


Figure 43 : Représentation à la sonde VIC d'une tumeur mutée KRAS.

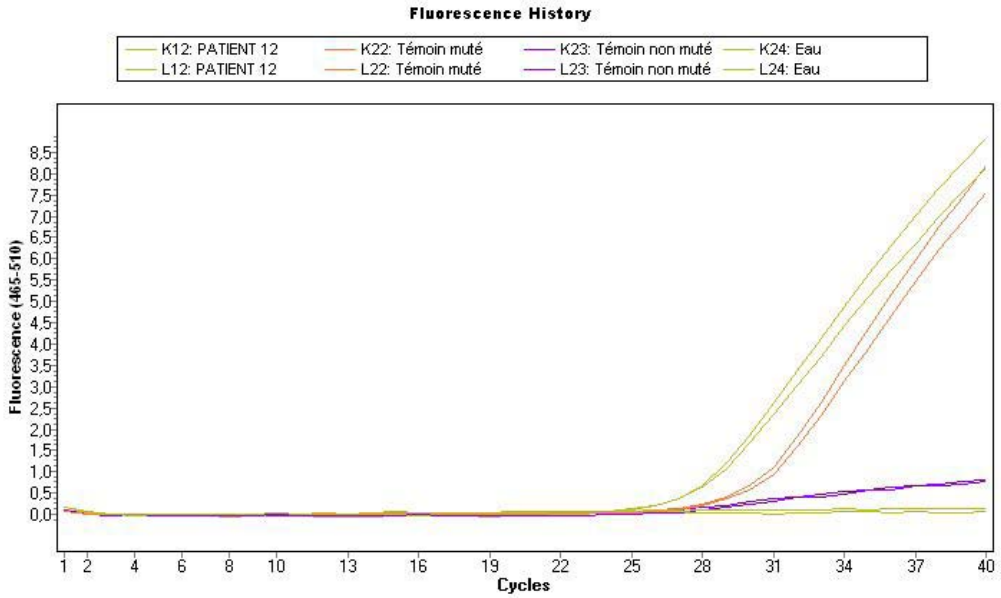


Figure 44 : Représentation à la sonde FAM d'une tumeur mutée KRAS.

3. PCR HRM

a. Principe

Cette technique repose sur l'intégration à de l'ADN amplifié par PCR d'un fluorochrome intercalant. L'augmentation de température programmée entraîne une dénaturation de certains fragments du brin d'ADN (domaines de fusion). Cette dénaturation provoque l'élimination du fluorochrome et induit donc une baisse de fluorescence, puis son extinction totale lorsque la dénaturation est complète. A une séquence d'ADN donnée correspond donc, pour une montée en température standard, une signature lumineuse spécifique représentée par une courbe de fusion. Si la séquence d'ADN analysée comporte des mutations ou des délétions, la signature change révélant ainsi l'existence d'un autre profil, voire d'une anomalie (figure 45).

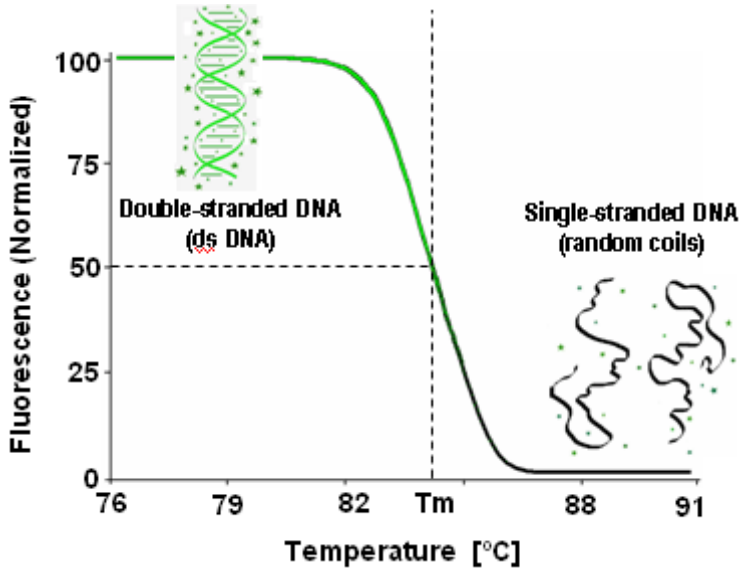


Figure 45: Principe de la PCR-HRM.

b. Analyse

Les résultats sont obtenus en 1 heure.
Grâce à cette technique on saura si la tumeur est porteuse de la mutation mais sans l'identifier.

La PCR-HRM commence par la préparation du MIX :

- MgCl2
- Amorce sens
- Amorce anti sens

- Master mix (contenant une molécule fluorescente)
- Eau

Une certaine quantité de mix est mélangé à l'ADN patient et témoin. Le mélange est ensuite déposé dans une plaque 384 puits et la plaque est mise dans l'appareil à analyse.

c. Exemple de résultat

- **NON muté**

La représentation des courbes de fusion montre que l'amplification pour ce puit est correcte car elle a la même allure le même niveau de fluorescence que pour les témoins muté et non muté (figure 46).

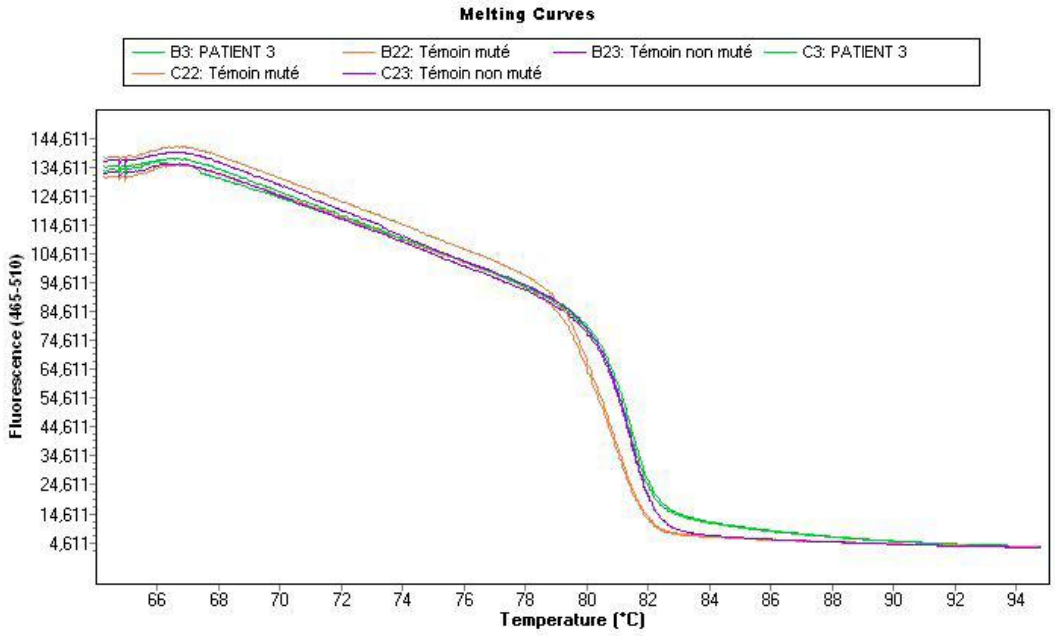


Figure 46 : Courbe d'amplification.

Les représentations « normalized melting curves » et « normalized and temp-shifted différence plot » sont interprétées ensemble pour conclure à une mutation ou non du gène KRAS.
Ici le patient a un profil se rapprochant pour les 2 représentations de celui du témoin non muté (figure 47 et 48).
On conclut donc à un patient non muté par la technique de la PCR HRM.

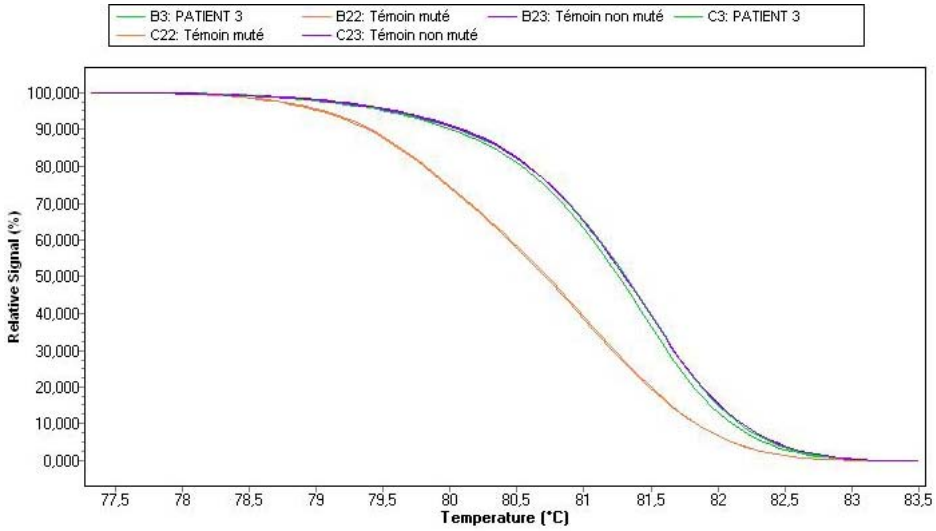


Figure 47 : Représentation « Normalized melting curves ». Le patient en vert suit le profil du témoin non muté violet.

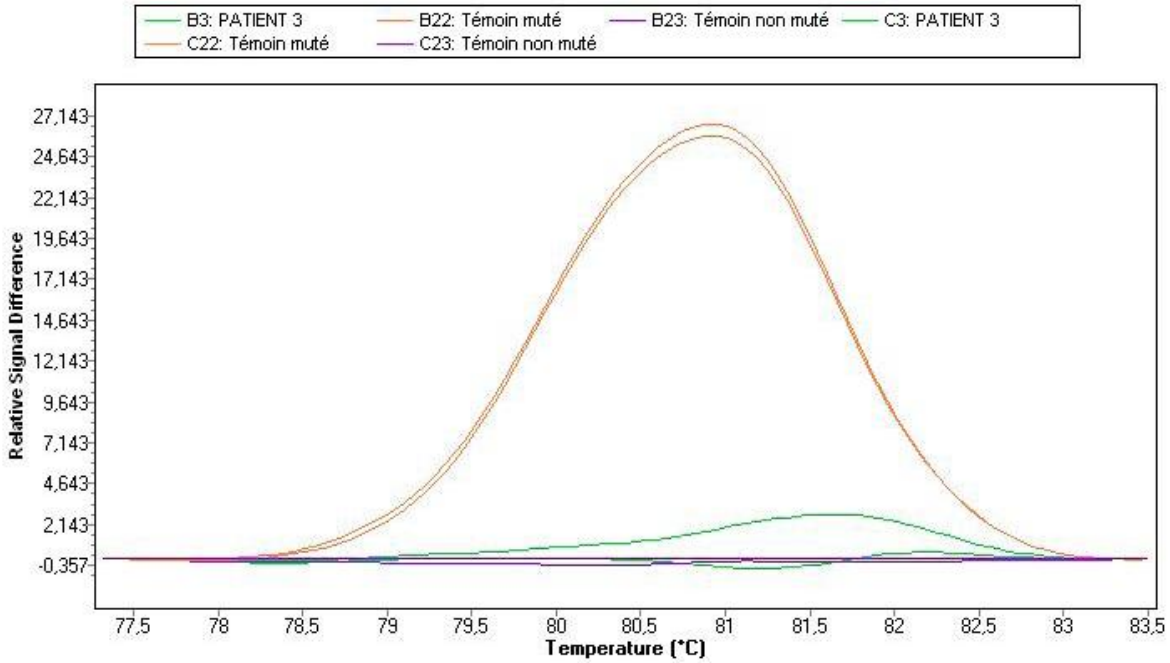


Figure 48 : Représentation « Normalized and temp-shifted difference plot ». Le patient en vert se situe près du témoin non mute.

- **Muté**

Le patient 12 a pour les deux représentations (figure 49 et 50), un profil se rapprochant du témoin muté. On peut conclure à un profil patient muté.

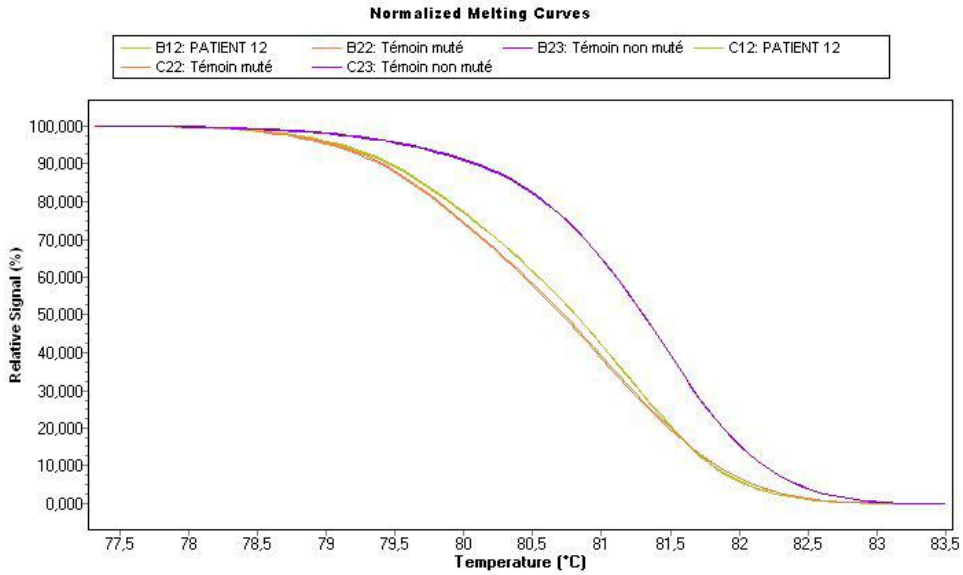


Figure 49 : Représentation « Normalized melting curves ». Le patient en orange se rapproche du témoin muté en rouge.

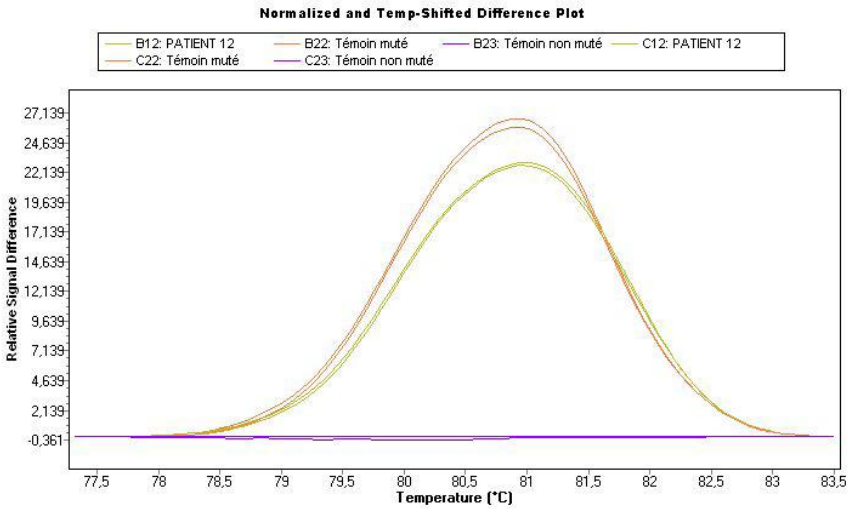


Figure 50 : Représentation « Normalized and temp-shifted difference plot". Le patient en orange a le même profil que le témoin mute violet.

4. Avantages et inconvénient de chaque méthode

Comme nous l'avons dit précédemment, il n'existe pas de recommandations générales pour le génotypage KRAS. La plateforme du CAV utilise 3 techniques dont les avantages et les inconvénients (tableau 7) sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 7 : Avantages et inconvénients des différentes méthodes utilisées par le CAV de Nancy (unité de biologie des tumeurs, 2009).

	PCR RFLP	**PCR Taqman**	**PCR HRM**
Durée moyenne	3 jours	2 heures	2 heures
Avantages	Technique sensible. Détection de toute variation génétique au niveau de l'amplicon.	Technique sensible. Rendu des résultats Rapide.	Technique sensible. Détection de toute variation génétique au niveau de l'amplicon. Rendu des résultats rapide
Inconvénients	Identification de la mutation par une autre technique. ADN digéré. Haut risque de contamination.	Détection d'une seule mutation par réaction.	Identification de la mutation par une autre technique.

IV. ENQUÊTE DE SATISFACTION

Dans l'esprit d'évaluation et de rechercher de la qualité, l'unité de biologie des tumeurs a envoyé une enquête de satisfaction (annexe) à 180 professionnels de santé de la région Lorraine, dont des oncologues, des gastro-entérologues, des médecins généralistes et des anatomopathologistes.

1. Etat des lieux

L'unité de biologie des tumeurs, reçoit les échantillons tumoraux inclus dans de la paraffine suite aux demandes de génotypage KRAS venant de professionnels de santé appartenant à différent domaine médical.
Le délai pour l'analyse du génotypage donné par le CAV est de 15 jours en moyenne.
Si l'analyse est concluante et après contrôle des résultats, le CAV envoie le compte rendu du résultat au prescripteur. Celui-ci pourra alors mettre en place le traitement le plus adapté au patient.
Si l'analyse n'est pas concluante, la plateforme refait l'analyse et si le résultat n'est toujours pas interprétable, un second bloc est demandé à l'anatomopathologiste. Le résultat ne peut pas être rendu si la zone sélectionnée contient peu de cellules tumorales ou si l'ADN n'est pas en concentration suffisante. Ce deuxième cas allonge le délai des 15 jours d'analyses car un nouveau bloc de paraffine sera demandé au pathologiste.
La figure 33 résume les interactions entre l'oncologue, la pathologiste et la plateforme

2. Statistiques de l'activité du service de juin 2008 à décembre 2009

De juin 2008 à décembre 2009, le CAV a analysé 844 blocs pour le génotypage KRAS. Parmi ces 844 blocs de paraffine, 3% (24/844) présentaient un ADN dégradé et n'ont donc pas pu être analysés. 334 blocs avaient une mutation KRAS. Cette mutation portait essentiellement sur le codon 12 (274/334).
Le CAV a utilisé les trois techniques décrites précédemment durant cette période mais 15 analyses ont conclues à des résultats discordants entre les techniques. La

PCR-RFLP a montré le plus fort pourcentage d'erreur (53% des cas discordants contre 33% pour Taqman et 13% pour la PCR-HRM). Suite à cette évaluation d'activité, Taqman et la PCR-HRM ont été retenues pour l'analyse de routine. Ces 2 techniques demandent moins de temps de préparation et d'analyse.

3. Questionnaire

Le questionnaire (annexe 1) permet d'évaluer l'activité du CAV pour le génotypage KRAS

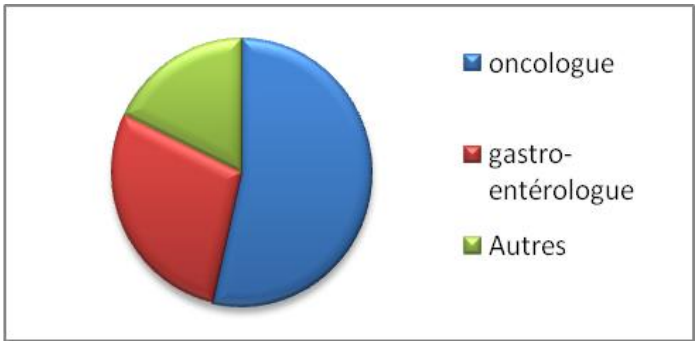
Un questionnaire a été envoyé à 180 médecins.
Au 12 février il y a 28 retours de questionnaire au CAV soit 40 réponses de médecins. Deux cabinets composés de plusieurs médecins (14) ont répondu de manière collégiale à notre questionnaire. Dans cette étude, nous ne prenons en compte que le nombre de retour et non le nombre exact de médecins (1 cabinet= 1 retour).

4. Enquête auprès de 180 professionnels de santé

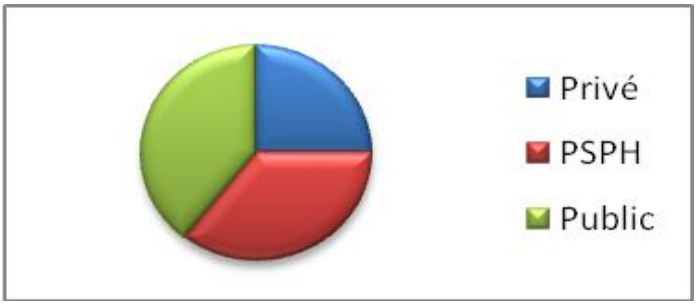
a. Vous

-Vous êtes ? Vous exercez ?

La majorité des professionnels de santé ayant répondu au questionnaire sont les oncologues à 54 % (15/28) suivi par les gastro-entérologues à 28% (8/28).
Les autres soignants sont les anathomopathologistes, internes, médecins généralistes et des chirurgiens. Ils représentent 18% (5/28)



Les soignants sont en majorité des professionnels du secteur public ou des PSPH.



b. Nos échanges

-Avez-vous facilement eu accès à nos coordonnées téléphoniques et de télécopie ? En cas de nécessité, avez-vous pu nous joindre facilement par téléphone ?

Les soignants disent avoir eu très facilement accès aux coordonnées téléphoniques et de télécopie. Même en cas de nécessité, il a était facile de joindre la plateforme par téléphone.

- **Lors d'entretiens téléphoniques avez-vous obtenu les renseignements attendus ?**

La plateforme a su répondre aux questions des professionnels.

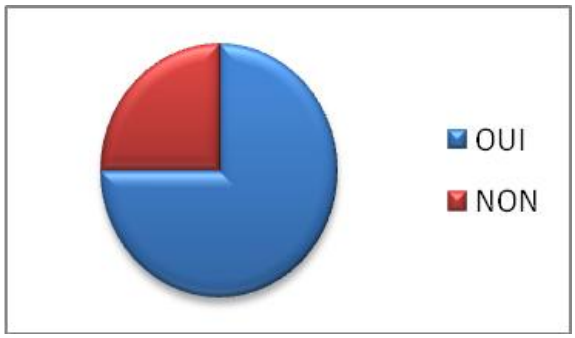
- **La feuille de prescription du génotypage KRAS vous convient-elle ?**

Un exemple de la fiche de prescription du génotypage KRAS est visible en annexe 2.
Il n'y a rien à redire sur la feuille du génotypage KRAS.

c. Les délais

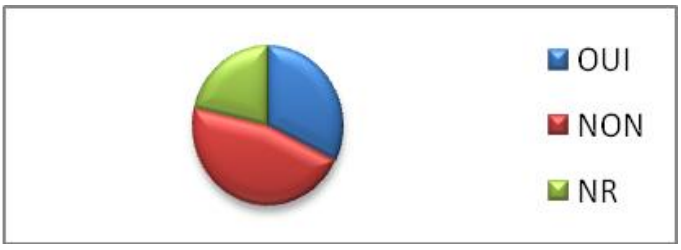
-Vos demandes de génotypages KRAS sont-elles traitées dans des délais satisfaisants ?
Si non, quel serait le délai maximal que vous souhaiteriez voir respecter

Les trois quart des professionnels estiment que leur demande de génotypage est traitée dans des délais satisfaisants. Ceux restants ne sont pas satisfaits du délai et voudraient le voir rapporté en moyenne à 13 jours.



- **En cas de retard d'analyse, avez-vous été informé des problèmes rencontrés et du retard envisagé ? Si non, comment préféreriez-vous être informé ?**

Sur 28 réponses, il y a eu 6 absentions. Sur les 22 restants 41% estiment avoir été informés du retard.



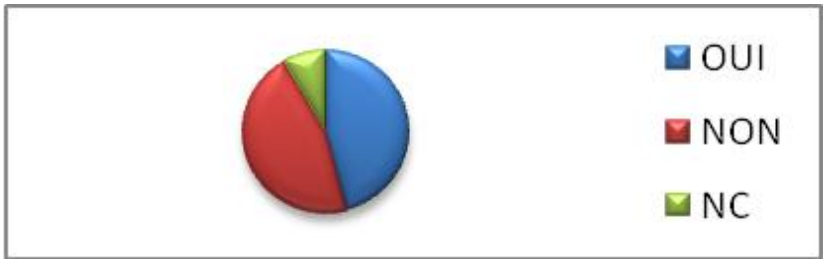
La majorité des participants préfèrerait être informé par fax puis par mail ou téléphone.

- **Etes-vous satisfait de la présentation du compte-rendu d'analyse ? Si non, quelles modifications souhaiteriez-vous y apporter ?**

Le compte rendu d'analyse est satisfaisant mais pourrait être amélioré en y inscrivant le pourcentage de cellules tumorales et saines.

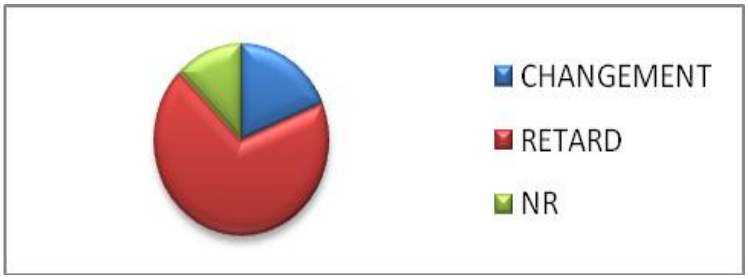
- **Pour les oncologues : Estimez-vous être toujours en possession des résultats de génotypage KRAS en temps utile pour pouvoir prendre les décisions thérapeutiques ?**

Cette question n'était destinée qu'aux oncologues au nombre de 15. Il y a eu 24 réponses dont 2 professionnels ont manifesté ne pas vouloir s'exprimer.
50% des professionnels sont en possession des résultats pour prendre les décisions en conséquence.



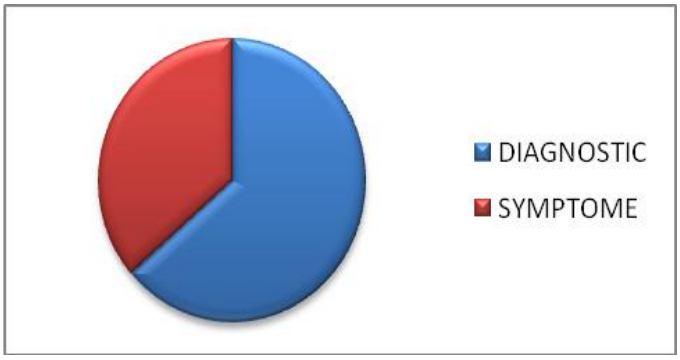
Si non, ce retard a-t-il une influence directe sur votre choix thérapeutique ?

Le retard influence le choix thérapeutique avec un retard dans l'instauration d'un traitement ciblée anti-EGFR.



- **Pensez-vous que le génotypage KRAS devrait être anticipé ? Si oui, a quel moment souhaiteriez-vous que le génotypage KRAS soit réalisé ?**

A 92%, le génotypage KRAS devrait être anticipé et, pour une majorité des médecins, au moment du diagnostic.



5. Analyse de l'enquête

a. Vous

Le taux de réponse est de 40/180 soit environ 22%.

Parmi les prescripteurs potentiels la majorité exerce en tant qu'oncologue, suivi par les gastro-entérologues.

b. Nos échanges

L'accès à la plateforme que se soit par fax ou téléphone est facilité. Les professionnels estiment avoir accès aux renseignements quand ils en ont besoin. La plateforme joue donc correctement son rôle d'acteur actif au sein de la triade clinicien/pathologiste/laboratoire.

La communication est un élément qu'il était important d'évaluer parce qu'elle permet d'assurer une qualité dans le trajet de la demande de génotypage KRAS.

c. Les délais

De la prescription à la communication des résultats, il doit y avoir en théorie 15 jours.75% des personnes interrogées sont satisfaites des délais de traitement du génotypage KRAS.

25% de personnes sont non satisfaites des délais dont 6 sont oncologues et 1 gastro-entérologue. En moyenne le délai proposé par les oncologues est de 12 jours contre 13 jours si l'on considère tous les participants.

53% des médecins ont été informés des problèmes quand il y a un retard.

Le CAV a pris des mesures pour réduire le temps d'analyse. En effet, Taqman et la PCR-HRM sont maintenant les deux techniques de routine. Comme il a été vu précédemment ces techniques nécessitent peu de temps d'analyse (2 heures environ). Au-delà de ces limites, la diminution du délai entre la prescription de l'analyse et l'instauration du traitement ne sera possible que si le clinicien et le pathologiste y participent également de manière active.

Le fax et le mail notamment crypté pour plus de sécurité et de confidentialité serait un bon moyen de pallier au retard dans la communication des résultats.

d. Délais et oncologues

9 oncologues sur 15 sont satisfaits du délai des 15 jours. Parmi ceux-ci 6 sont en possession des résultats lors du choix de la thérapeutique.

A contrario les 6 autres sont non satisfaits du délai et ne sont jamais en possession des résultats en temps voulu.

Une amélioration des délais s'impose donc pour la plateforme nancéenne.

D'une façon générale, les oncologues font le choix d'un retard dans la prise en charge du patient s'ils n'ont pas de résultats. Le retard dans le rendu de l'analyse influence l'instauration du diagnostic mais pas le choix de la molécule. La prise en charge du patient reste de qualité car il pourra bénéficier du traitement qui lui est le plus adapté. Mais ce retard peut être mal vécu par le patient déjà fragilisé par la maladie.

Tout en respectant les recommandations de l'INCa, c'est-à-dire un diagnostic de cancer colorectal métastatiques, le génotypage devrait être anticipé au moment du diagnostic. Cela permettra d'instaurer rapidement le traitement.

CONCLUSION

Le cancer colorectal est le deuxième cancer le plus meurtrier après celui des poumons dans les pays occidentaux. Le dépistage de masse de la population générale est une nécessité pour tenter de diminuer la mortalité due à ce cancer en France. La mesure 14 du plan cancer 2009-2013 prévoit de lutter contre les inégalités d'accès et de recours au dépistage.

Une coloscopie est réalisée après un résultat positif à l'Hemoccult II ainsi qu'un bilan complet du patient comprenant un examen biologique, une échographie hépatique, une radiographie pulmonaire. En fonction des résultats de ces analyses, la maladie sera classée en stade et une thérapeutique adaptée sera instaurée.

La prise en charge du cancer colorectal métastatique a évolué grâce à l'apparition des thérapies ciblées notamment celles anti-EGFR en 2008. La survie globale et la survie sans progression ont été améliorées. Le cétuximab et le panitumumab sont deux anticorps monoclonaux anti-EGFR ayant une AMM pour le cancer colorectal métastatique sans mutation KRAS de la tumeur. Alternativement, le bévacizumab, qui est un anticorps anti-VEGF peut être prescrit que la tumeur soit mutée KRAS ou non.

La recherche de la mutation KRAS est devenue un test important dans la prise en charge du patient. C'est le seul facteur prédictif de réponse au traitement par anticorps monoclonaux anti-EGFR validé. Mais l'utilisation de ces molécules ne garanti pas la réussite du traitement car de nombreuses études ont montré que d'autres facteurs seraient susceptible d'intervenir comme BRAF, PI3K, PTEN ou encore l'expression du récepteur à l'EGF. De plus, en relation avec un polymorphisme germinal des récepteurs Fc gamma, chaque patient possède un génotype qui lui est propre, susceptible d'influer également dans la réponse aux anticorps monoclonaux.

Le génotypage KRAS est organisé en Lorraine par l'unité de biologie des tumeurs du centre Alexis Vautrin de Nancy. La demande de génotypage est envoyée par le clinicien au pathologiste. Celui-ci, après désarchivage des prélèvements tumoraux antérieurs, va analyser le bloc de paraffine incluant une partie de la tumeur pour définir la zone où il y a plus de 50% de cellules tumorales. Le laboratoire réalise l'analyse de l'ADN tumoral de cette zone au moyen de trois techniques. Entre la prescription du génotypage et du rendu des résultats, il s'écoule en moyenne 15 jours.

Une enquête de satisfaction a été envoyée par le laboratoire à 180 professionnels de santé lorrains. Cette enquête met en avant le rôle primordial de la collaboration entre les cliniciens, les anatomopathologistes et le laboratoire, qui s'avère être un élément-clé dans la prise en charge optimale du patient cancéreux. Suite à cette enquête, et dans le cadre de l'optimisation de la prise en charge du patient, le CAV a optimisé l'approche technique utilisée pour réduire ses temps d'analyse.

GLOSSAIRE DE CHIMIOTHERAPIE

LV5FU standard = Acide folinique en perfusion à 200mg/m2 + 5-fluoro-uracile en bolus à 400mg/m2 + 5-fluoro-uracile en perfusion à 600mg/m2

FUFOL = Acide folinique en bolus à 20mg/m2 + 5-fluoro-uracile à 350mg/m2 en perfusion lente

FOLFOX 4 = Acide folinique en perfusion à 200mg/m2 + 5-fluoro-uracile en bolus à 400mg/m2 + 5-fluoro-uracile en perfusion à 600mg/m2 + oxaliplatine à 85mg/m2

FOLFOX 7 = Acide folinique en perfusion à 400 mg/m2 + 5-fluoro-uracile en perfusion à 1200 mg/m2 + oxaliplatine à 130 mg/m2

FOLFOXIRI = Acide folinique + 5-fluoro-uracile + oxaliplatine + irinotécan

FOLFOX + cétuximab = Acide folinique à 200 mg/m2 + 5-fluoro-uracile en bolus à 400 mg/m2 + 5-fluoro-uracile à 600 mg/m2 + oxaliplatine 85 mg/kg + cétuximab

FOLFOX + bévacizumab = Acide folinique à 200 mg/m2 + 5-fluoro-uracile en bolus à 400 mg/m2 + 5-fluoro-uracile à 600 mg/m2 + oxaliplatine 85 mg/m2 + bévacizumab à 5mg/kg

XELOX = oxaliplatine à 130 mg/m2 + capécitabine à 1000 mg/m2

FOLFIRI = Acide folinique à 180 mg/m2 + 5-fluoro-uracile en bolus à 400 mg/m2 + 5-fluoro-uracile à 1200 mg/m2 + irinotécan à 180 mg/m2

XELIRI = irinotécan 240 mg/m2 + capécitabine à 1000mg/m2

IRINOX = irinotécan + oxaliplatine

TOMOX = raltitrexed à 3 mg/m2 + oxaliplatine à 130 mg/m2

FOLFIRINOX = Acide folinique à 180mg/m2 + 5-fluoro-uracile en bolus à 400mg/m2 + 5-fluoro-uracile à 1200mg/m2 + irinotécan à 180mg/m2 + oxaliplatine à 180mg/m2

BIBLIOGRAPHIE

A

Alzari PM, Lascombe M, Poljak RJ. Three-dimensional structure of antibodies. *Annu. Rev.Immunol*. 1988 ; 6 : 555-580 .

Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, *et al*. Wild-Type KRAS is required for Panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol*. 2008 ; 26:1626-1634.

B

Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese, *et al*. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti–Epidermal Growth Factor Receptor antibody therapies. *Cancer Res*. 2007 ; 67 : 2643–2648.

Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, Thezenas S, Ychou M, Blanchard F, Lamy A, et al. Impact of Fc-RIIa-Fc-RIIIa Polymorphisms and KRAS Mutations on the Clinical Outcome of Patients With Metastatic Colorectal Cancer Treated With Cetuximab Plus Irinotecan. JCO. 2009 ; 27 : 1122-1129.

Bibeau F, Frugier H, Denouel A, Sabourin J-C, Boissiere-Michot F.Technical considerations for KRAS testing in colorectal cancer. The pathologist's point of view. *Bull Cancer*. 2009 ; 96 : 15-22.

Blons H, Laurent-Puig P. Aspect technique de la détermination du statut KRAS dans le cancer colorectal et mise en place en France. Point de vue du biologiste. *Bull Cancer.* 2009 ; 96 : 47-55.

Busam KJ, Capodieci P, Motzer R et al. Cutaneous side-effects in cancer patients treated with the antiepidermal growth factor receptor antibody C225*. Br J Dermatol*. 2001 ; 144 : 1169–1176.

C

Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. Clin Cancer Res. 2001 ; 7 : 2958–2970.

Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, *et al.* Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol.* 2005 ; 23 : 1803-10.

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, *et al.* Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2004 ; 351 : 337-345.

D

Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, *et al*. Une forme sauvage de *BRAF* est nécessaire à la réponse au panitumumab ou au cétuximab dans le cancer colorectal métastatique. *J Clin Oncol*. 2008 ; 26 : 5705-5712.

E

Esser A.F. Big MAC attack : complement proteins cause leaky patches*. Immunol Today*. 1991 ; 12 : 316-318.

F

Faivre J, Dancourt V. Le dépistage du cancer colorectal certitudes et questions. *Gastroenterol Clin Biol.* 2002 ; 26 : 86-93.

Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, *et al*. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2007 ; 97 : 1139 – 1145.

G

Gentile M S, Vasu C, Green A, Murillo G, Das Gupta T, Constantinou A, et al. Targeting colon cancer cells with genistein-17.1A immunoconjugate. Bull Cancer. 2003 ; 22 : 955-959.

Grandjouan S. Surveillance des sujets à risque très élevé de cancer colorectal (polyposes, cancer colique héréditaire sans polypose). *Acta Endoscopica*. 2002 ; 32 : 633-654.

Guldenfels IC, Briançon S, Houot O, Junod B, Deschamps J-P. Comparaison du rapport coût/efficacité de deux tests de dépistage des tumeurs colo-rectales dans un centre d'examen de sante. *Acta Endoscopica*. 1990 ; 20 : 27-32.

H

Herbst R, Shin D. Monoclonal Antibodies to Target Epidermal Growth Factor Receptor–Positive Tumors. A New Paradigm for Cancer Therapy Cancer. *Cancer*. 2002 ; 94 : 1593-1611.

Hill C, Doyon F. The frequency of cancer in France: mortality trends since 1950 and summary of the report on the causes of cancer. *Bull Cancer*. 2008 ; 95 : 5-10.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, *et al.* Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas : correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol.* 2003 ; 21 : 3798-807.

J

Jacobs B, De Roock W, Piessevaux H, et al. Amphiregulin and Epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab*. J Clin Oncol*. 2009 ;27 : 5068-5074.

Jost M, Kari C, Rodeck U. The EGF receptor-an essential regulator of multiple epidermal functions. *Eur J Dermatol*. 2000 ; 10 : 505-510.

K

Khambata-Ford S., Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, *et al* Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J.Clin.Oncol*. 2007; 25 : 3230-3237.

L

Lanier LL., Phillips J.H. Evidence for three types of human cytotoxic lymphocyte. Immunol. Today. 1986 ; 7 : 132.

Lecomte T. Les polyposes coliques : rôle de l'endoscopie et de la chromoendoscopie. Pour quels patients demander un conseil génétique? *Acta endoscopica*. 2006 ; 36 : 473-474.

Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, *et al*. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2008 ; 26 : 374-379.

M

Mandel JS, Church TR, Bond JH, Ederer F, Geisser MS, Mongin SJ, *et al*. The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2000 ; 343 : 1603-1607.

Meert AP, Martin B, Verdebout JM, Paesmans M, Lothaire P, Bosschaerts T, *et al*. Corrélation entre l'expression d'EGF-R dans les biopsies et les pièces chirurgicales des cancers bronchiques. *Rev Mal Respir*. 2003 ; 20 : 347-53.

Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Ichikawa A, Maekawa M, Shitoh K, *et al.* Extensive methylation of *hMLH1* promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. Gastroenterology. 2001 ; 121 : 1300-1309.

Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Emlet DR, Montgomery RB, and Wong AJ. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factorreceptor. *J. Biol. Chem*. 1998 ; 273 : 200–206.

N

Novotny J., Sharp K. Electrostatic fields in antibodies and antibody/antigen complexes. Prog. Biophys. Mol. Biol. 1992 ; 58 : 203-204.

O

Olschwang S, Bonaïti C, Feingold J, Frébourg T, Grandjouan S, Lasset C, *et al.* Identification and management of HNPCC syndrome (hereditary non polyposis colon cancer), hereditary predisposition to colorectal and endometrial adenocarcinomas. *Bull Cancer*. 2004 ; 91: 303-315.

P

Parker S, Tony Tong, Sherry Bolden, Phyllis A. Wingo. Cancer Statistics. *CA Cancer J clin*. 1997 ; 47 : 5-27.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: GLOBOCAN 2000. *Inst. J. Cancer*. 2001 ; 94 : 153-156.

Park JG, Park YJ, WIijnen JT,Vasen H. Gene environnement interaction in hereditary nonpolyosis colorectal cancer with implications for diagnosis and genetic testing. *Int*. *J. Cancer*. 1999 ; 82 : 516–519.

Perkins G, Lièvre A, Ramacci C, Méatchi T, de Reynies A, Emile JF, *et al*. Additional value of EGFR downstream signaling phosphoprotein expression to KRAS status for response to anti-EGFR antibodies in colorectal cancer. Int J Cancer. 2010.

Prenen H, De Schutter J, Jacobs B, De Roock W, Biesmans B, Claes B, *et al*. PIK3CA mutations are not a major determinant of resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor inhibitor cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 ; 15 : 3184-3188.

Perez-Soler R. Can rash associated with HER1 /EGFR inhibittion be used as a marker of traetment outcome ? *Oncology*. 2003 ; 17 : 33-38.

Pérez-Soler R, Delord JP, Halpern A, Kelly K, Krueger J, Sureda BM, et al. HER1/EGFR Inhibitor-Associated Rash: Future Directions for Management and Investigation Outcomes from the HER1/EGFR Inhibitor Rash Management Forum. *Oncologist.* 2005 ; 10 : 345–356.

Prin-Mathieu C, Aguilar P, Béné MC, Faure G, Kolopp-Sarda MN. Anticorps monoclonaux, anticorps thérapeutiques. Revue Française des Laboratoires. 2003 ; 357 : 31-39.

S

Samowitz WS, Albertsen H, Sweeney C, Herrick J, Caan BJ, Anderson KE, *et al*. Association of Smoking, CpG Island Methylator Phenotype, and V600E BRAF Mutations in Colon Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006 ; 98 : 1731 –1738.

Schneider-Merck T, Lammerts van Bueren JJ, Berger S, Rossen K, van Berkel PH, Derer S, Beyer T *et al.* Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *J Immunol*. 2010 ; 184 : 512-520.

Segaert S, Van CE. Clinical signs, pathophysiology and management of skin toxicity during therapy with epidermal groth factor receptor inhibitors. *Ann. Oncol*. 2005 ; 16 : 1425-1433.

Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers Predicting Clinical Outcome of Epidermal GrowthFactor Receptor – Targeted Therapy in Metastatic Colorectal. *J Natl Cancer Inst.* 2009 ; 101 : 1308-1324.

Souglakos J, Philips J, Wang R, Marwah S, Silver M, Tzardi M, *et al*. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009 ; 101 : 465-472.

Spano JP, Vignot S. Récepteurs de l'EGF dans les cancers colorectaux : ciblage et implication thérapeutique. *Bull cancer. 2007 ; 94 : 171-6.*

Spano JP. Qu'est-ce qu'une thérapie ciblée ? Le point de vue du clinicien. *Bull cancer*. 2007; 94 : 111-4.

T

Thomas SM, Grandis JR. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of EGFR inhibitors under clinical investigation. *Cancer Treat Rev*. 2004 ; 30 : 255–268.

V

Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, *et al*. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009 ; 360 : 1408-17.

Van Cutsem E., Mayer R., Gold P. Correlation of acne rash and tumor response with cetuximab monotherapy in patients with colorectal cancer refractory to both irinotecan and oxaliplatine. *Eur J Cancer*. 2004 ; 279 : 85-86.

Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, and Poulsen HS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann. Oncol*.1997 ; 8 : 1197–1206.

W

Wells A. EGF receptors. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 ; 31 :637-643.

Z

Zhang W, Gordon M, Schultheis AM, Yang DY, Nagashima F, Azuma M, *et al*. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol*. 2007 ; 25 : 3712-3718.

OUVRAGES CONSULTÉS

- AMGEN, cahier VERTIBIX®
- Cancéroguide, 2007.
- HAS. Guide ALD n°30. 2008.
- INCa. Bilan national de l'activité des plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers en 2008. 2009.
- INCa. Dépistage organisé du cancer colorectal. 2008
- INCa. Fiches repère, nutrition et prévention des cancers. 2009
- INCa. Guide de référence. Les traitements du cancer du côlon. 2010
- INCa. Les traitements du cancer du côlon. 2010.
- Kaufman Howard, Wadler Scott, Antman Karen. Molecular targeting in oncology. 2008.
- Merck, Cahier ERBITUX®
- Oncolor, Carol et Oncolie. Référentiel régionaux de bonnes pratiques en cancérologie digestive. 2009.
- PIPAM (Pôle Interministriel de prospective et d'anticipation des mutations économiques). Réflexion prospective autour des biomarqueurs. 2009

SITES INTERNET CONSULTÉS

- http://www.ama-assn.org
- http://www.e-cancer.fr/Oncolor
- www.inserm.fr/thematiques/cancer/dossier/cancer-colorectal
- http://www.oncoprof.net
- http://www.who.int/fr

ANNEXE 1

ENQUETE DE SATISFACTION

PLATEFORME REGIONALE LORRAINE
DE GENOTYPAGE *KRAS*

1. Vous êtes :
☐ Oncologue
☐ Anatomopathologiste
☐ Secrétaire
☐ Autre : .....

2. Vous exercez dans le secteur
☐ Privé
☐ Public

3. Avez-vous facilement eu accès à nos coordonnées téléphoniques et de télécopie ?
☐ Oui
☐ Non

4. En cas de nécessité, avez-vous pu nous joindre facilement par téléphone ?
☐ Oui
☐ Non

5. Lors d' entretiens téléphoniques avez-vous obtenu les renseignements attendus ?
☐ Oui
☐ Non

6. La feuille de prescription du génotypage *KRAS* vous convient-elle ?
☐ Oui
☐ Non
Si non, quelles modifications souhaiteriez-vous y voir apportées ?
.....
.....
.....
.....

7. Vos demandes de génotypage *KRAS* sont-elles traitées dans des délais satisfaisants ?
☐ Oui
☐ Non
Si non, quel serait le délai maximal que vous souhaiteriez voir respectées ?

.....
.....
.....
.....

8. En cas de retard d'analyse, avez-vous été informé des problèmes rencontrés et du retard envisagé?
☐ Oui
☐ Non

Si non, comment préféreriez-vous être informé ?
☐ Téléphone
☐ Fax

9. Etes-vous satisfait de la présentation du compte-rendu d'analyse?
☐ Oui
☐ Non
Si non, quelles modifications souhaiteriez-vous y apporter ?
.....
.....
.....
.....

10. Pour les oncologues : Estimez-vous être toujours en possession des résultats de génotypage *KRAS* en temps utile pour pouvoir prendre les décisions thérapeutiques ?
☐ Oui
☐ Non

Si non, ce retard a-t-il une influence directe sur votre choix thérapeutique ?
☐ Oui
☐ Non

Si oui, de quelle nature ?
☐ Changement de stratégie thérapeutique
☐ Retard dans l'instauration d'une thérapie ciblée anti-EGFR

11. Pensez-vous que le génotypage *KRAS* devrait être anticipé ?
☐ Oui
☐ Non

Si oui, a quel moment souhaiteriez-vous que le génotypage *KRAS* soit réalisé ?
☐ Au diagnostic
☐ Dès les premiers signes cliniques pronostiques d'un risque d'évolution métastatique

12. Pour les anatomopathologistes du secteur privé: Etes-vous satisfait des modalités de défraiement du désarchivage des blocs ?

☐ Oui
☐ Non

13. Ce questionnaire peut demeurer anonyme si vous le souhaitez. Néanmoins, pour envisager de personnaliser notre relation, vous pouvez nous indiquer vos coordonnées

Nom : .....
Prénom : .....
Spécialité : .....
Adresse : .....
Téléphone : ...../...../...../...../.....
Mail :..... @.....
Fax : ...../...../...../...../.....

14. Avez-vous d'autres suggestions à nous soumettre ?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Nous vous remercions d'avoir complété ce questionnaire et de nous permettre ainsi d'évaluer et d'améliorer la qualité de notre service.

ANNEXE 2

Demande de génotypage K-Ras du cancer colorectal
- FICHE DE SUIVI -

Partie réservée au pathologiste référent

Recommandations destinées au pathologiste :

Sélectionnez un bloc tumoral représentatif de la tumeur, de préférence un bloc de la résection chirurgicale plutôt que la biopsie initiale, ou un bloc provenant d'une exérèse chirurgicale d'une localisation métastatique. Un pourcentage d'au moins 50 % de cellules tumorales est souhaitable. En deçà, le résultat ne sera validé qu'en cas de mutation de K-Ras avérée (pour éviter de faux négatifs).

Ensuite, 2 options s'offrent à vous :

- *Soit l'envoi du bloc directement au centre effectuant le génotypage*
- *Soit la préparation de 3 à 5 copeaux de 10 microns (éventuellement après macrodissection du bloc pour éliminer les zones non tumorales) à déposer dans des tubes « type nalgène » et à acheminer rapidement au centre responsable du génotypage*

- Date de réception de la demande : . . / . . / . . . .
- Prélèvement :
  - ❑ frais/congelé
  - ❑ inclus en paraffine

Identité du prélèvement vérifiée ❑

- Présence de cellules cancéreuses en quantité suffisante autorisant la réalisation du test K-Ras :
  - ❑ oui
  - ❑ non
- Fixateur utilisé* : . . . . . .

*Attention : tous fixateurs possibles sauf liquide de Bouin et autre fixateur à base d'acide picrique (examen non réalisable si le prélèvement a été au contact du liquide de Bouin).

- Date de transmission du prélèvement au laboratoire responsable du génotypage moléculaire :

. . / . . / . . . .

- Nom du pathologiste : . . . . . .
- Signature du pathologiste :

Cachet

Réalisation du génotypage K-Ras

- Date de réception de la demande : . . / . . / . . . .
- Technique utilisée :
  - ❑ PCR quantitative
  - ❑ séquençage direct

Résultats :

❑ K-Ras muté ❑ K-Ras non muté

❑ Echantillon non analysable : Motif : . . . . . .

- Remarques : . . . . . .
- Date du résultat : . . / . . / . . . .
- Résultat transmis au médecin demandeur le : . . / . . / . . . .

MERCK SERONO

Demande de génotypage K-Ras du cancer colorectal
- FICHE DE SUIVI -

Partie réservée au demandeur du génotypage K-Ras

• **Date de la demande :** ..../..../....

❑ Monsieur ❑ Madame

• **Nom :** ..... • **Prénom :** .....

• **Date de naissance :** ../../.... • **Lieu de naissance :** .....

• **Compte-rendu anatomopathologique n°:** ..... • **En date du :** ../../...

• **Examen effectué par le service ou cabinet d'anatomie pathologique de :** .....

.....

.....

• **Commentaires :** .....

.....

.....

.....

.....

• **Motivation de la demande**

❑ Ciblage du traitement ❑ Autre raison

• **Prélèvement concerné par le génotypage**

❑ Tumeur primitive ❑ Colon ❑ Rectum | ❑ Métastase ❑ Hépatique ❑ Pulmonaire ❑ Autre .....

.....

.....

• **Type de prélèvement**

❑ Biopsie ❑ Pièce opératoire

• **Traitement(s) antérieur(s) au prélèvement**

❑ Aucun ❑ Chimiothérapie ❑ Radiothérapie

Merci de bien vouloir réaliser une identification du statut mutationnel du gène K-Ras

• **Nom du médecin demandeur du test :** .....

• **Signature du médecin demandeur du test :**

Cachet

MERCK SERONO

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 17 juin 2010

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présenté par PARENTE Sandra

Sujet : Diagnostic moléculaire des cancers colorectaux métastatiques : facteurs prédictifs de réponse aux anti-EGFR et organisation du génotypage KRAS en Lorraine.

Jury :

Président :M. Jean-Louis MERLIN, Professeur
Directeur :M. Jean-Louis MERLIN, Professeur

Juges :
Mme Béatrice DEMORE, Maître de conférence à la faculté de pharmacie de Nancy
Mme Marie-Christine KAMINSKY, oncologue médical au Centre Alexis Vautrin de Nancy

Vu,

Nancy, le 7 mai 2010

Le Président du Jury — Le Directeur de Thèse

M. Jean-Louis Merlin — M. Jean-Louis Merlin

Pr Jean-Louis MERLIN
Unité de Biologie des Tumeurs
Centre Alexis Vautrin
Avenue de Bourgogne
54511 Vandoeuvre lès Nancy - France
jl.merlin@nancy.fnclcc.fr

Vu et approuvé,

Nancy, le 17 MAI 2010

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy I,

Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le 21.05.2010

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy I,

Pour le Président
et par Délégation,
La Vice-Présidente du Conseil
des Etudes et de la Vie Universitaire,

Jean-Pierre FINANCE

C. CAPPELLE-ATKINSON

N° d'enregistrement : 3296

N° d'identification :

TITRE

Diagnostic moléculaire des cancers colorectaux métastasiques. Facteurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées anti-EGFR et organisation du génotypage KRAS en Lorraine.

Thèse soutenue le 17 juin 2010 par PARENTE Sandra

RESUME :

Avec environ 30 000 nouveaux cas par an, le cancer colorectal est un problème majeur de santé publique en France. C'est le deuxième cancer le plus meurtrier après celui des poumons dans les pays occidentaux. Le dépistage joue un rôle fondamental dans la détection précoce de ce cancer. La chirurgie et la chimiothérapie sont les deux stratégies thérapeutiques utilisées en cas de cancer colorectal. Et selon le stade de la maladie l'une ou l'autre ou les deux serviront à prendre en charge le patient.
L'arsenal thérapeutique mis à la disposition du clinicien à évoluer récemment avec l'apparition des thérapies ciblées notamment anti-EGFR (cétuximab et panitumumab). Ces thérapies sont utilisées en cas de cancer colorectal métastasique présentant une tumeur non mutée au niveau du gène KRAS. Le traitement du cancer devient ainsi un traitement propre à l'état pathologique de chaque patient. Pour permettre l'accès à ces analyses à l'ensemble de la population française, l'Institut National du Cancer (INCa) à mis en place dès 2006 des plateformes régionales de génétique tumorale. En Lorraine, cette plateforme est commune au CHU et au Centre Régional de Lutte contre le Cancer Alexis Vautrin. Dans les cancers colorectaux, c'est l'Unité de Biologie des Tumeurs au centre Alexis Vautrin de Nancy qui centralise la recherche de mutations KRAS. Cette organisation repose sur la mise en place d'un réseau collaboratif entre les cliniciens prescripteurs, les anatomopathologistes et le laboratoire de génotype, dont la performance conditionne directement la qualité des analyses en termes de délai de rendu de résultats. Entre juin 2008 et décembre 2009, ce sont plus de 800 cas de cancers colorectaux qui ont été analysés au Centre Alexis Vautrin, pour l'ensemble de la région lorraine. Fin 2009, une enquête diligentée par l'Unité de Biologie des Tumeurs, a été diffusée afin de connaître son niveau d'efficience. Cette enquête, dont les résultats sont analysés dans cette thèse, met en évidence l'extrême importance des délais de rendu des résultats pour une prise en charge optimale du patient cancéreux.

MOTS CLES : KRAS, EGFR, cétuximab, panitumumab, cancer colorectal, anticorps monoclonaux, génotypage, facteurs prédictifs de réponse aux traitements.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
M. Jean-Louis MERLIN, Professeur		Expérimentale ☐ Bibliographique ☐ Thème ☐

Thèmes 1 – Sciences fondamentales 2 – Hygiène/Environnement
3 – Médicament 4 – Alimentation – Nutrition
5 - Biologie 6 – Pratique professionnelle